

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Untersuchung einer diskriminierenden quantitativen reverse-
Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis
mutierter Coronaviren bei Katzen mit feliner infektiöser
Peritonitis

von Laura Mareike Sangl
aus München

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Nicolai T. Siegel

Tag der Promotion: 08. Februar 2020

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	10
II. LITERATURÜBERSICHT	11
1. Pathogenese feliner enteraler Coronavirusinfektionen	11
1.1. Prävalenz von feline Coronaviren	12
1.1.1. Ausscheidungsprävalenz	12
1.1.2. Antikörperprävalenz.....	13
1.1.3. Prävalenz verschiedener Serotypen.....	14
1.2. Replikationszyklus von feline Coronaviren	17
1.2.1. Bindung an die Oberflächenrezeptoren.....	17
1.2.2. Endozytose des Virus	18
1.2.3. Replikation des Virus	18
1.2.4. Ausschleusung des Virus	19
1.3. Virusausscheidung und Übertragung	20
1.3.1. Ausscheidung	20
1.3.2. Super- und Reinfektion	21
1.3.3. Übertragung.....	22
1.4. Resistenz gegen feline Coronaviren.....	23
2. Pathogenese der feline infektiösen Peritonitis	24
2.1. Entstehung mutierter feline Coronaviren.....	24
2.1.1. Mutationen im Spike-Gen	26
2.1.2. Mutationen im open reading frame 3c	27
2.1.3. Mutationen im open reading frame 7b	28
2.1.4. Weitere Mutationen.....	28
2.2. Immunpathogenese.....	29
2.2.1. Virämie und Aktivierung von Makrophagen	30
2.2.2. Immunreaktionen	32
2.2.2.1. Humorale Immunantwort	32
2.2.2.2. Zelluläre Immunantwort.....	34
III. PUBLIKATION I.....	35
IV. PUBLIKATION II.....	46
V. DISKUSSION	55

VI. ZUSAMMENFASSUNG.....	66
VII. SUMMARY	68
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	70
IX. DANKSAGUNG	93

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADE	antibody-dependent enhancement (Antikörperabhängige Verstärkung)
BLD	below limit of detection (unterhalb des Detektionslimits)
bzw.	beziehungsweise
C3	Komplementfaktor C3
CCV	canines Coronavirus
E	envelope (Hülle)
ER	endoplasmic reticulum (endoplasmatisches Retikulum)
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment (ER-Golgi-Intermediärkompartiment)
et al.	et alii (und andere)
fAPN	feline Aminopeptidase N
FCoV	felines Coronavirus
Fc-Rezeptor	fragment-crystalline-Rezeptor
fDC-SIGN	feline dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin (felines dendritisches zellspezifisches interzelluläres Adhäsionsmolekül grabbing Nonintegrin)
FHV-1	felines Herpesvirus-1
FIP	feline infektiöse Peritonitis
gRNA	genomic ribonucleic acid (genomische Ribonukleinsäure)
GWAS	genome-wide association study (genomweite Assoziationsstudien)
ICAM	intercellular adhesion molecule (interzelluläres Adhäsionsmolekül)

ICC	immunocytochemistry (Immunzytochemie)
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IND	indeterminate (nicht ermittelbar)
k. A.	keine Angabe
M	Membran
MAbs	monoclonal antibodies (monoklonale Antikörper)
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrom-Coronavirus
MHV	murines Hepatitis-Virus
MMP-9	Matrix-Metalloprotease 9
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
M1058L	Substitution Leucin zu Methionin an Position 1058 des Spike-Proteins
N	Nukleokapsid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSP	Nichtstrukturprotein
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
p. i.	post infectionem
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

RTC	replication/transcription complex Replikations-Transkriptions-Komplex
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction (reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
RT-qPCR	real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (quantitative reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
S	Spike
sgRNA	subgenomic ribonucleic acid (subgenomische Ribonukleinsäure)
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SPF	spezifisch Pathogen-frei
S1060A	Substitution Serin zu Alanin an Position 1060 des Spike-Proteins
TGEV	Transmissible-Gastroenteritis-Virus
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UK	United Kingdom (Vereinigtes Königreich)
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Die feline infektiöse Peritonitis (FIP) wurde erstmals in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts als tödliche Erkrankung bei Katzen detailliert beschrieben (WOLFE und GRIESEMER, 1966). Der Auslöser, das feline Coronavirus (FCoV), ist überall in der Katzenpopulation zu finden. Dabei ist die FCoV-Prävalenz abhängig von der Anzahl der Katzen im Haushalt (BELL et al., 2006a). FCoV-spezifische Antikörper werden bei bis zu 87 % der Katzen in Mehrkatzenhaushalten gefunden (PEDERSEN, 1976), aber nur bei 5-12 % der Tiere mit einer FCoV-Infektion kommt es zum Ausbruch der Erkrankung (ADDIE und JARRETT, 1992).

FCoV ist in Form von zwei Pathotypen in der felines Population zu finden. Zum einen als wenig-pathogenes FCoV, ein vergleichsweise harmloser Durchfallerreger, und zum anderen als FIP-auslösendes FCoV (PEDERSEN et al., 1981b; PEDERSEN et al., 1981a; PEDERSEN et al., 1984b). Als Auslöser von FIP wird die Entstehung einer Mutation im FCoV im Körper der Katze verantwortlich gemacht („internal mutation hypothesis“) (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998). Dabei kommt es nach fäkal-oraler Übertragung zur Replikation von wenig-pathogenem FCoV in den Enterozyten und anschließend bei einigen Katzen zur Mutation in FIP-auslösendes FCoV mit Änderung des viralen Zelltropismus (STODDART und SCOTT, 1989; POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998; ROTTIER et al., 2005). Die Mutationstheorie wird unterstützt durch die Entdeckung zweier Nukleotid-Mutationen an Position 23531 und 23537 im Spike-Gen von FCoV, durch die die beiden Pathotypen in über 95 % der Fälle differenziert werden konnten (CHANG et al., 2012). Folge der Mutationen sind die Aminosäure-Substitutionen Methionin zu Leucin an Position 1058 (M1058L) und Serin zu Alanin an Position 1060 (S1060A) des Spike-Proteins.

Ziel dieser Arbeit war es, Gewebe sowie Augenkammerwasser von Katzen mit FIP mittels einer quantitativen reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) auf oben genannte Mutationen hin zu untersuchen. Damit sollte überprüft werden, inwiefern die Mutationen im Spike-Gen von FCoV eine Rolle bei der Entstehung von FIP spielen und ob Kammerwasser als mögliches Probenmaterial für die RT-qPCR bei Katzen zur Diagnose von FIP geeignet ist.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Pathogenese feliner enteraler Coronavirusinfektionen

Coronaviren sind behüllte, einzelsträngige Viren, die eine Ribonukleinsäure (RNA) mit positiver Polarität besitzen. Sie gehören zu den RNA-Viren mit dem größten bekannten Genom (GORBALENYA et al., 2006; HAGEMEIJER et al., 2012). Coronaviren enthalten vier Strukturproteine: Das Spike-(S-), Membran-(M-), Hüll-(E-) und Nukleokapsid-(N-) Protein (FEHR und PERLMAN, 2015). Die prägnantesten Strukturen des Virus sind die keulenartig geformten Trimere des S-Proteins, welche über die Oberfläche hinausragen und dem Virus aufgrund ihres kronenförmigen Aussehens seinen Namen gaben (DELMAS und LAUDE, 1990; FEHR und PERLMAN, 2015). Die S-Proteine sind unter anderem essentiell für Bindung und Fusion des Virus mit der Wirtszelle (OLSEN, 1993). Die kleineren M-Proteine ragen, im Gegensatz zu den S-Proteinen, nur zu einem geringen Teil mit ihrem N-terminalen Ende über die Hülle des Virus hinaus (SPAAN et al., 1988). Als Oberflächenproteine des Virus sind die M- und E-Proteine an verschiedenen Prozessen der Virusreplikation beteiligt (KIPAR und MELI, 2014). Die N-Proteine umhüllen die FCoV-RNA und spielen eine wichtige Rolle bei der Formation des helikalen Nukleokapsids (SPAAN et al., 1988). Eine schematische Darstellung der viralen FCoV-Struktur ist in Abbildung 1 zu sehen.

Durch die den RNA-Viren eigene schnelle Replikation und hohe Mutationsrate während der Replikation (DOMINGO und HOLLAND, 1997; DENISON et al., 2011) sind Coronaviren in der Lage, sich innerhalb kurzer Zeit auf neue Wirte einzustellen oder ihren Gewebstropismus zu ändern (LI, 2016). Coronaviren sind als Auslöser von enteralen und respiratorischen Erkrankungen bei Mensch und Tier bekannt (DYE und SIDDELL, 2005). Vertreter in der Tiermedizin sind unter anderem das canine Coronavirus (CCV), das murine Hepatitis-Virus (MHV), das porcine Transmissible-Gastroenteritis-Virus (TGEV), das Middle East Respiratory Syndrom-Coronavirus (MERS-CoV) und das FCoV (HORZINEK et al., 1982; FEHR und PERLMAN, 2015). FCoV kommt in zwei Pathotypen (oder Biotypen) vor. Der erste, wenig-pathogene Pathotyp vermehrt sich vor allem in Enterozyten und ist weit in der Katzenpopulation verbreitet, verursacht aber nur selten klinische Symptome. Der zweite Pathotyp ist Auslöser der feline infektiösen Peritonitis

(FIP) (PEDERSEN et al., 1981a).

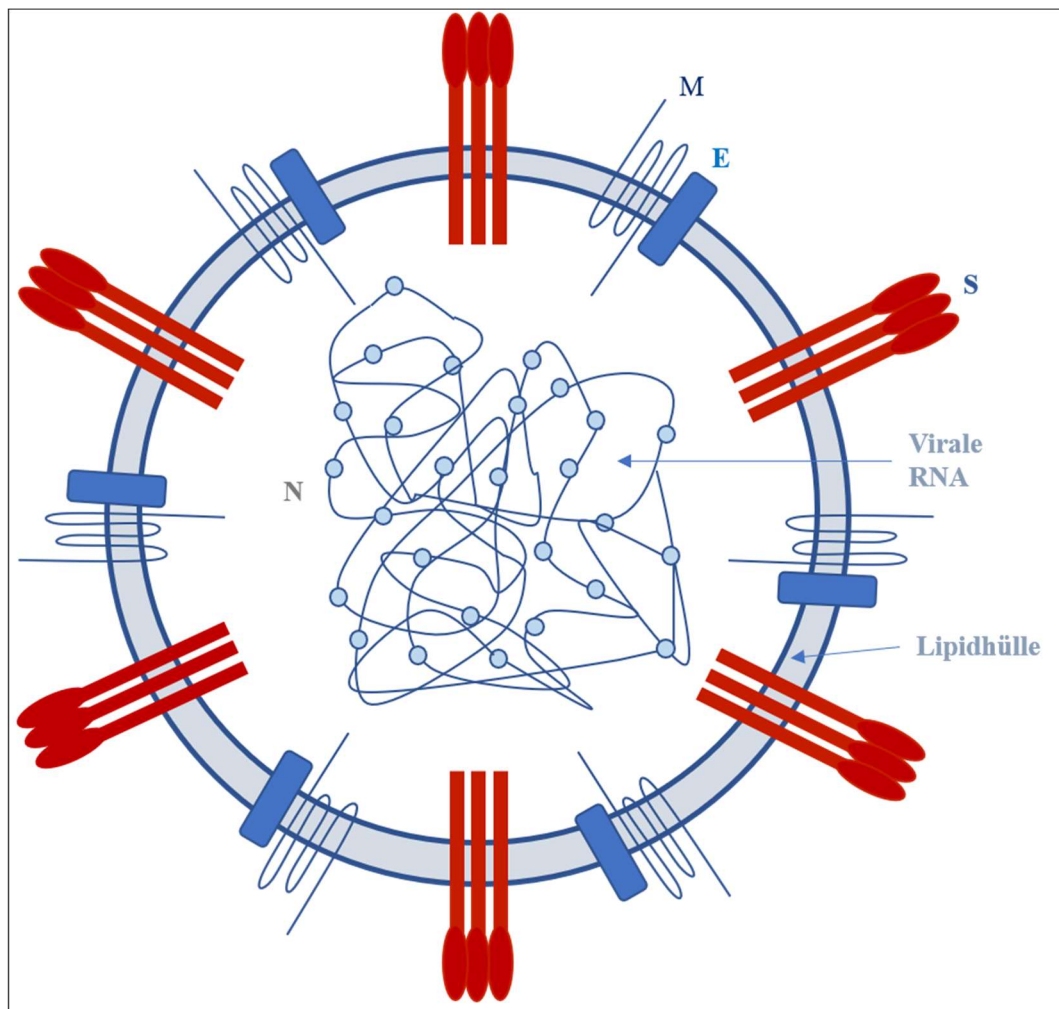


Abbildung 1. Schematische Skizze des feline Coronavirus, modifiziert nach Kipar und Meli (KIPAR und MELI, 2014); E: Hüll-Protein (envelope), M: Membran-Protein, N: Nukleokapsid-Protein, S: Spike-Protein

1.1. Prävalenz von feline Coronaviren

FCoV sind weltweit verbreitet. Es gibt nur wenige entlegene Inseln, wie die Falkland-Inseln und die Galapagos-Inseln, auf denen kein FCoV gefunden wurde (LEVY et al., 2008; ADDIE et al., 2012). Während die Antikörper-Prävalenz in Mehrkatzenhaushalten bei über 80 % liegt (TAHARAGUCHI et al., 2012), lassen sich bei solitär lebenden Streunern oft keine Antikörper nachweisen (BELL et al., 2006a).

1.1.1. Ausscheidungsprävalenz

In nahezu allen Mehrkatzenhaushalten mit mehr als sechs Tieren ist FCoV nachweisbar, und mindestens 60 % der Katzen in diesen Haushalten scheiden FCoV

mit dem Kot aus (PEDERSEN, 2009). Bei einzeln lebenden Streunern dagegen ist die Infektion selten. So wurde bei mehr als der Hälfte der streunenden Katzen, die initial kein FCoV ausschieden, bereits eine Woche nach Aufnahme in ein Tierheim FCoV im Kot mittels reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen (PEDERSEN et al., 2004). Die Prävalenz der Ausscheidung von FCoV bei Katzen in verschiedenen Ländern ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Prävalenz der fäkalen Ausscheidung von felinem Coronavirus in verschiedenen Ländern (FCoV: felines Coronavirus, RT-PCR: reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, USA: United States of America)

Autor	Anzahl an Katzen	Untersuchte Population	Ausscheidungsprävalenz	Land
LI et al. (2019)	54	gesund	72 %	China
AN et al. (2011)	212	krank oder gesund	7 %	Korea
SHARIF et al. (2009)	44	gesund	84 %	Malaysia
PEDERSEN et al. (2004)	162	gesund	33 %	USA (Kalifornien)

1.1.2. Antikörperprävalenz

Noch höher als die Ausscheidungsprävalenz ist die Prävalenz von FCoV-Antikörpern in der felines Population. In Mehrkatzenhaushalten haben 53-87 % der Tiere Antikörper gegen FCoV, während die Antikörperprävalenz bei Tieren in Einzelhaltung bei lediglich 15 % liegt (PEDERSEN, 1976; HORZINEK und OSTERHAUS, 1979b; ADDIE und JARRETT, 1992; SPARKES et al., 1992a; SPARKES et al., 1992b; ADDIE, 2000; ADDIE et al., 2009). In Tierheimen wurde eine Zunahme der Antikörperprävalenz mit der Länge der Aufenthaltsdauer der Katzen nachgewiesen. Katzen, die mehr als 60 Tage in einem Tierheim verbrachten, waren mehr als fünfmal häufiger Antikörper-positiv als solche, die kürzer blieben (CAVE et al., 2004). Dagegen lag die Antikörperprävalenz bei wildlebenden Katzen mit 18 % deutlich niedriger (LURIA et al., 2004). Die Antikörperprävalenz von FCoV in verschiedenen Ländern ist in Tabelle 2

dargestellt.

Tabelle 2: Antikörperprävalenz von feline Coronaviren in verschiedenen Ländern (UK: United Kingdom, k. A.: keine Angabe)

Autor	Anzahl an Katzen	Untersuchte Population	Antikörperprävalenz	Land
TEKELIOGLU et al. (2015)	169	krank	31 %	Türkei (Istanbul)
TAHARAGUCHI et al. (2012)	17 392	k. A.	67 % (reinrassige Katzen) 31 % (Mischlinge)	Japan
AN et al. (2011)	212	krank oder gesund	14 %	Korea
HOLST et al. (2006)	209	gesund	31 %	Schweden
BELL et al. (2006a)	49	k. A., Streuner	0 %	Australien (Sydney)
BELL et al. (2006a)	206	krank oder gesund, Hauskatzen	34 %	Australien (Sydney)
CAVE et al. (2004)	2207	gesund	26 %	UK

1.1.3. Prävalenz verschiedener Serotypen

In der Katzenpopulation existieren zwei verschiedene FCoV-Serotypen. Beide können als wenig-pathogenes FCoV vorkommen oder auch FIP auslösen (PEDERSEN et al., 1984b; SHIBA et al., 2007). FCoV vom Serotyp I und Serotyp II unterscheiden sich in ihren S-Proteinen und können anhand einer Sequenzanalyse des S-Gens (MOTOKAWA et al., 1995) sowie der Reaktion neutralisierender monoklonaler Antikörper (MAbs) mit Teilen des S-Proteins (HOHDATSU et al., 1991b) differenziert werden.

FCoV-Serotyp-I ist rein feline Ursprungs (ADDIE et al., 2003; BENETKA et al., 2004). FCoV-Serotyp-II hingegen ist durch Rekombination zwischen dem FCoV-

Serotyp-I und dem CCV entstanden und weist ein dem CCV-ähnliches S-Protein auf (HERREWEGH et al., 1998). Dies wird durch den Grad der Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der jeweiligen S-Proteine veranschaulicht: bei den S-Proteinen von FCoV-Serotyp-II und CCV liegt die Übereinstimmung bei über 90 %, während sie innerhalb der FCoV-Serotypen lediglich bei 46-67 % liegt (HOHDATSU et al., 1991c; ADDIE et al., 2003). FCoV-Serotyp-II ist, ähnlich wie CCV, leicht in Zellkulturen anzuzüchten, während FCoV-Serotyp-I sehr schwer kultivierbar ist (VENNEMA, 1999).

Der Anteil von FCoV-Serotyp-I und -II in der Katzenpopulation ist weltweit unterschiedlich (Tabelle 3). FCoV-Serotyp-I ist vorherrschend in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) (PEDERSEN, 2014a). In einer Studie in England wurde bei 27/28 FCoV-Stämmen FCoV-Serotyp-I identifiziert (ADDIE et al., 2003). In der Schweiz hatten 4 % der gesunden Tiere Antikörper gegen FCoV-Serotyp-II. Bei 35 % der Tiere wurden Antikörper gegen FCoV-Serotyp-I gefunden, und 11 % der Tiere hatten Antikörper gegen beide Serotypen (Tabelle 3) (KUMMROW et al., 2005).

Auch bei Tieren mit FIP kommen beide Serotypen vor. In einer Studie in Österreich wurden bei 86 % der Katzen mit FIP Antikörper gegen FCoV-Serotyp-I, bei 7 % Antikörper gegen FCoV-Serotyp-II und bei weiteren 7 % Antikörper gegen beide Serotypen gefunden (BENETKA et al., 2004). In der Schweiz hatten 83 % der Katzen mit FIP Antikörper gegen FCoV-Serotyp-I und 17 % Antikörper gegen FCoV-Serotyp-I und FCoV-Serotyp-II (KUMMROW et al., 2005). Im asiatischen Raum ist FCoV-Serotyp-II bei Katzen mit FIP häufiger verbreitet. Eine Studie in Japan fand einen Anteil von 69 % FCoV-Serotyp-I-Antigen und 31 % FCoV-Serotyp-II-Antigen mittels ELISA bei Katzen mit FIP (HOHDATSU et al., 1992). In Tabelle 3 wird ein Überblick über die verschiedenen Serotypen in den unterschiedlichen Ländern gegeben.

Tabelle 3: Vorkommen der beiden feline Coronavirus-Serotypen-I und -II in verschiedenen Ländern (FCoV: felines Coronavirus, k. A.: keine Angabe, FIP: Feline infektiöse Peritonitis)

Autor	Anzahl an Katzen	Untersuchte Population	Probenmaterial	FCoV-Serotyp-I	FCoV-Serotyp-II	Mischinfektion	Land
LIN et al. (2009b)	74	gesund	k. A.	96 %	4 %	0 %	Taiwan
LIN et al. (2009b)	38	FIP	Vollblut, Konjunktivalabstrich, Kot, Erguss	74 %	11 %	16 %	Taiwan
KUMMROW et al. (2005)	296	gesund	Serum	35 %	4 %	11 %	Schweiz
KUMMROW et al. (2005)	30	FIP	Serum	83 %	0 %	17 %	Schweiz
BENETKA et al. (2004)	74	FIP	Organproben	86 %	7 %	7 %	Österreich
ADDIE et al. (2003)	43	gesund	Kot	98 %	2 %	0 %	England
HOHDATSU et al. (1992)	42	FIP	Serum	69 %	31 %	0 %	Japan

1.2. Replikationszyklus von feline Coronaviren

Für die Replikation müssen Viren ihr Genom in eine Zelle einschleusen (BURKARD et al., 2014). Um dies zu erreichen, wählen sie einen von zwei unterschiedlichen Wegen. Entweder kommt es zur direkten Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran des Wirtes, oder das Virus wird mittels Endozytose aufgenommen und die Fusion der Zellmembranen findet im Inneren der Zelle statt (VAN HAMME et al., 2008; BURKARD et al., 2014). Unter Endozytose versteht man die Aufnahme von Partikeln in die Wirtszelle über Vesikel, welche durch Abschnürung von der Plasmamembran der Wirtszelle entstanden sind (CONNER und SCHMID, 2003). FCoV gelangt über Endozytose in das Innere der Zelle und entlässt das Genom in das Zytosol. Dort findet die Replikation statt. Das fertige Virus wird am Ende aus dem Zytosol ausgeschleust (FEHR und PERLMAN, 2015). Der Replikationszyklus von FCoV ist in Abbildung 2 dargestellt.

1.2.1. Bindung an die Oberflächenrezeptoren

Der Eintritt von FCoV in die Zelle wird durch die Bindung des S-Proteins an einen Oberflächenrezeptor der Wirtszelle initiiert (BOSCH et al., 2003). Dabei sind bislang zwei Oberflächenrezeptoren der FCoV bekannt: die feline Aminopeptidase N (fAPN) sowie das feline dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin (fDC-SIGN) (HOHDATSU et al., 1998a; REGAN und WHITTAKER, 2008; VAN HAMME et al., 2011). Beide Rezeptoren, fAPN und fDC-SIGN, befinden sich in cholesterin-reichen Mikrodomänen („lipid rafts“) der Zellmembran (CAMBI et al., 2004; NOMURA et al., 2004). Das S-Protein von FCoV setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen. Das S1-Protein vermittelt die Bindung an den Oberflächenrezeptor der Wirtszelle, während das S2-Protein für die Fusion von Zellmembran und Wirtsmembran verantwortlich ist (BOSCH et al., 2003; PEDERSEN, 2014b; XIA et al., 2014).

Die FCoV-Serotypen-I und -II binden mit unterschiedlicher Präferenz an einen der beiden Rezeptoren (VAN HAMME et al., 2011). FCoV-Serotyp-I benutzt in 65 % der Fälle fDC-SIGN und in 35 % der Fälle einen bisher unbekannten Rezeptor zum Eintritt in die Zelle. Wurde der Rezeptor fAPN der Wirtszelle blockiert, beeinflusste dies weder die Bindung noch die Infektion von Monozyten durch FCoV-Serotyp-I. Demnach spielt fAPN bei der Bindung von FCoV-Serotyp-I an

die Wirtszelle keine Rolle. FCoV-Serotyp-II hingegen nutzt zu 60 % den Rezeptor fAPN und zu 40 % einen bisher unbekannten Rezeptor. Bei Blockade des Rezeptors fDC-SIGN wurde zwar die Bindung von FCoV-Serotyp-II nicht beeinflusst, allerdings sank die Infektionsrate der Monozyten. Damit scheint sich die Anwesenheit von fDC-SIGN auf die Infektion von Monozyten fördernd auszuwirken (VAN HAMME et al., 2011).

1.2.2. Endozytose des Virus

Im Anschluss an die Bindung zwischen Oberflächenrezeptor der Wirtszelle und S-Protein kommt es zur Endozytose des Virus mit Bildung des sogenannten (sog.) Endosoms (JAIMES und WHITTAKER, 2018). Damit das Virus zur Replikation in das Innere der Zelle gelangen kann, muss eine Fusion von viraler Zellmembran und Wirtsmembran stattfinden (BURKARD et al., 2014; JAIMES und WHITTAKER, 2018). Dies wird durch Spaltung des S-Proteins in der S2-Region mittels Proteasen initiiert, wodurch erst die Fusionsdomäne und dann das Fusionspeptid freigelegt werden (FEHR und PERLMAN, 2015). Durch Insertion des Fusionspeptids in die äußere, zelluläre Membran und Veränderungen in der Konformation des S-Proteins kommt es zur Verschmelzung von viraler und zellulärer Membran und damit zur Entlassung der viralen RNA in das Zytosol der Wirtszelle (BELOUZARD et al., 2012; FEHR und PERLMAN, 2015). Als zuständige Proteasen für die Spaltung des S-Proteins von FCoV-Serotyp-II wurden Cathepsin L und Cathepsin B beschrieben, welche sich bereits im Endosom befinden (REGAN et al., 2008). Für FCoV-Serotyp-I gibt es bisher diesbezüglich keine Studien.

1.2.3. Replikation des Virus

Für die anschließend stattfindende Replikation des FCoV-Genoms sind Replikasen nötig, welche durch Translation des Replikase-Gens des FCoV entstehen. Dieses enthält zwei offene Leseraster, Rep1a und Rep1b, die für die beiden Polyproteine ppl1a und ppl1b codieren. Die entstandenen Polyproteine wiederum werden in elf und 16 einzelne Nichtstrukturproteine (NSP) gespalten. Die entstehenden NSP bilden zusammen mit dem Golgi-Apparat der Zelle und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) einen Komplex zur Transkription der Strukturproteine und Replikation des FCoV-Genoms (replication/transcription complex, RTC) (PEDERSEN, 2014a; FEHR und PERLMAN, 2015; JAIMES und WHITTAKER,

2018).

Bei der Replikation des FCoV-Genoms entstehen sowohl genomische RNA (gRNA, codiert für das Genom) als auch subgenomische RNA (sgRNA, codiert für einzelne Proteine) (FEHR und PERLMAN, 2015; JAIMES und WHITTAKER, 2018). Strukturproteine, wie das S-, E-, N- und M-Protein werden durch Ablesen der sgRNA produziert (FEHR und PERLMAN, 2015). Die entstandenen Strukturproteine S, E und M werden anschließend in das endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC) transportiert und glykosyliert (KRIJNSE-LOCKER et al., 1994). Das N-Protein assoziiert sich mit dem neu produzierten viralen Genom und tritt in Kontakt mit dem sich im ERGIC befindlichen M-Protein, um die Produktion eines neuen Virus abzuschließen (BOSCH et al., 2005; FEHR und PERLMAN, 2015).

1.2.4. Ausschleusung des Virus

Durch Vorwölben in die Membran des ERGIC werden N-Protein und Genom mit den Strukturproteinen S, E und M umgeben, wodurch die Hülle des neuen Virus entsteht (KLUMPERMAN et al., 1994; KRIJNSE-LOCKER et al., 1994; CORSE und MACHAMER, 2000). Anschließend wird das Virus in Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert und hier mittels Exozytose freigesetzt (FEHR und PERLMAN, 2015; JAIMES und WHITTAKER, 2018) (Abbildung 2).

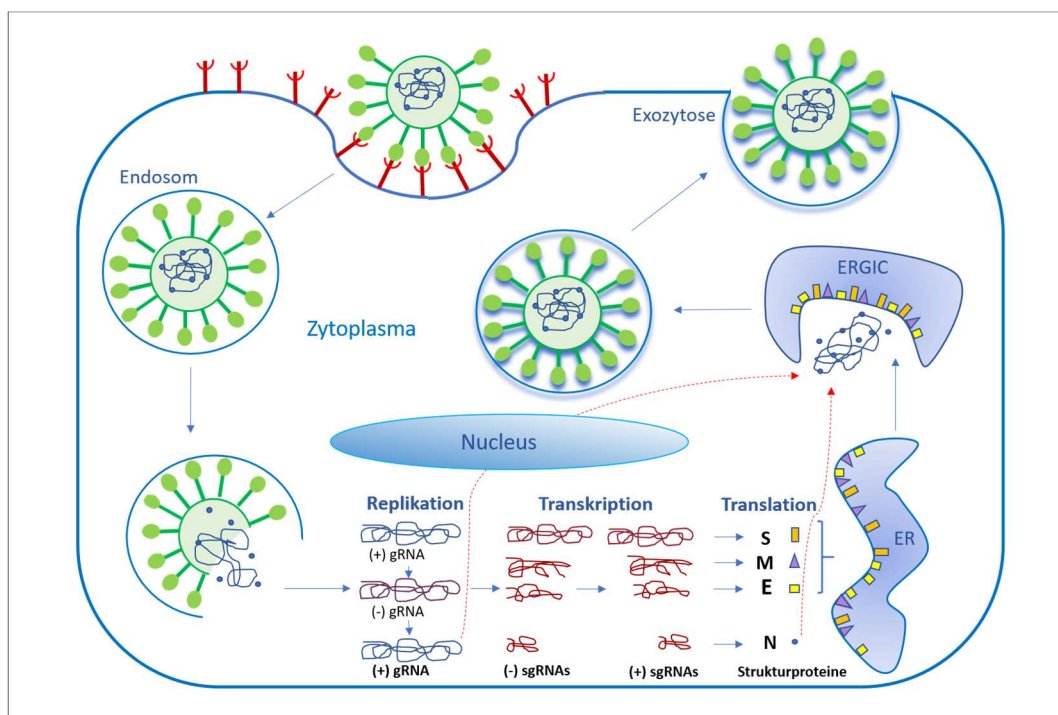


Abbildung 2: Replikationszyklus des feline Coronavirus, modifiziert nach

Jaimes und Whittaker (JAIMES und WHITTAKER, 2018); gRNA: genomische RNA , sgRNA: subgenomische RNA, ER: endoplasmatisches Retikulum, ERGIC: ER-Golgi-Intermediärkompartiment, E: Hüll-Protein (envelope-Protein), M: Membran-Protein, N: Nukleokapsid-Protein, S: Spike-Protein

1.3. Virusausscheidung und Übertragung

FCoV ist in nahezu sämtlichen Mehrkatzenhaushalten vorhanden, in denen mehr als sechs Tiere leben (PEDERSEN, 2009). Das Vorhandensein von chronischen Virusausscheidern sowie generell höhere Ausscheidungsprävalenz in einem Mehrkatzenhaushalt sind Risikofaktoren für das Entstehen einer FIP (FOLEY et al., 1997a). Um Letzteres zu verhindern, müssten das Virus und damit vor allem chronische Ausscheider komplett aus dem Tierbestand eliminiert werden (FOLEY et al., 1997a; ADDIE et al., 2004). Im Folgenden wird ein Überblick über Ausscheidungsmuster und Übertragung von FCoV gegeben.

1.3.1. Ausscheidung

Nach Infektion der Enterozyten persistiert FCoV vor allem in Epithelzellen des Kolons, aber auch des Dünndarms und Rektums. Durch Replikation des Virus in diesen Zellen kommt es zu einer Virusausscheidung im Kot (HERREWEGH et al., 1997; KIPAR et al., 2010). Eine Ausscheidung des Virus mit dem Kot wurde nach experimenteller Infektion mit FCoV-Serotyp-I bereits ab dem zweiten Tag post infectionem (p. i.) beobachtet (MELI et al., 2004; KIPAR et al., 2010).

Es existieren drei verschiedene Ausscheidungsmuster für FCoV nach experimenteller Infektion. Katzen vom Ausscheidungstyp 1 sind chronische, zum Teil lebenslange Ausscheider (ADDIE und JARRETT, 2001; PEDERSEN et al., 2008). Bis zu 13 % aller Katzen, die in Kontakt mit FCoV kommen, werden zu persistierenden Virusausscheidern (ADDIE und JARRETT, 2001). Diese Katzen sind als Carrier hauptsächlich für die Aufrechterhaltung einer Infektion in Mehrkatzenhaushalten verantwortlich (FOLEY et al., 1997b; HERREWEGH et al., 1997; ADDIE und JARRETT, 2001). Da in 95 % der Fälle Katzen weniger als neun Monate lang FCoV fäkal ausscheiden, wird eine Katze mit Ausscheidung über einen Zeitraum von neun Monaten oder mehr als Carrier angesehen (ADDIE und JARRETT, 2001). Katzen vom Ausscheidungstyp 2 sind vorübergehend infizierte Katzen mit fäkalen Virusausscheidung, die das Virus anschließend eliminieren und

auch keine Antikörper mehr haben, jedoch anfällig für eine Reinfektion bleiben (ADDIE und JARRETT, 2001; ADDIE et al., 2003). Die Zeit zwischen Beendigung der Virusausscheidung und negativem Antikörpertiter kann dabei bis zu 25 Monate betragen (ADDIE und JARRETT, 2001). Katzen mit Ausscheidungstyp 3 scheiden FCoV intermittierend mit bis zu zehn Ausscheidungszyklen aus. Hierbei muss allerdings auch eine Reinfektion von Katzen in Betracht gezogen werden, die das Virus möglicherweise bereits eliminiert hatten (ADDIE und JARRETT, 2001).

Die Menge an ausgeschiedenem Virus wird vom Alter der Tiere beeinflusst. Zwei bis vier Monate alte Katzenwelpen aus einer spezifisch Pathogen-freien-(SPF)-Haltung schieden nach experimenteller oraler Erstinfektion mit FCoV signifikant mehr Viruspartikel fäkal aus als Tiere aus SPF-Haltung, die erst im Alter von zwei bis acht Jahren erstmals infiziert wurden (PEDERSEN et al., 2008). Aufgrund des noch unausgereiften Immunsystems der jungen Katzen kommt es zu einer hohen Replikationsrate des Virus (PEDERSEN et al., 2008).

Katzen mit hohen Antikörpertitern scheiden mit höherer Wahrscheinlichkeit FCoV aus als Katzen mit niedrigen Antikörpertitern (ADDIE und JARRETT, 2001; PEDERSEN et al., 2008). Bei einem Antikörpertiter von 1:160 schieden 49 % der Tiere einer Studie FCoV aus, bei einem Antikörpertiter von 1:1280 stieg die Ausscheidungsprävalenz auf 78 % (ADDIE und JARRETT, 2001).

1.3.2. Super- und Reinfektion

Bei Katzen mit FCoV-Ausscheidungsmuster 2 kann nach Beendigung der Virusausscheidung eine Reinfektion beobachtet werden - entweder erneut mit demselben FCoV-Stamm oder einem anderen FCoV-Stamm (ADDIE et al., 2003). Existierten mehrere FCoV-Stämme in der Umgebung der Tiere, wurde bei der Mehrzahl der Tiere dennoch nur ein Virusstamm im Kot detektiert. Allerdings wurde von einer möglichen Superinfektion dreier Katzen mit zwei verschiedenen FCoV-Stämmen berichtet (ADDIE et al., 2003). Eine Studie untersuchte die genetische Verwandtschaft von FCoV-Stämmen bei Katzen mit FIP, bei denen FCoV sowohl im Kot als auch systemisch in Gewebe oder Aszites gefunden wurde (CHANG et al., 2010). Dabei bestand eine größere genetische Verwandtschaft des im Kot gefundenen FCoV mit den FCoV-Stämmen, die im Kot von Partnertieren vorhanden waren, als zwischen im Kot und Gewebe beziehungsweise (bzw.) Aszites gefundenem FCoV in einer Katze. Man kann daher von einer

Superinfektion der Tiere durch FCoV aus der Umgebung ausgehen (CHANG et al., 2010).

1.3.3. Übertragung

Eine Übertragung des Virus erfolgt meist horizontal über oralen Kontakt mit infiziertem Kot oder mit Kot verschmutzten Gegenständen (PEDERSEN, 2014b). In der Umwelt kann FCoV über einen Zeitraum von drei bis sieben Wochen infektiös bleiben. Es wird aber durch die meisten Haushaltsreiniger schnell inaktiviert (HOSKINS, 1993). Um eine Infektion hervorzurufen, sind bereits geringe Mengen des Virus ausreichend (VOGEL et al., 2010).

Diskutiert wird nach wie vor, ab welchem Alter sich Katzenwelpen infizieren und FCoV ausscheiden können. Um die Infektion von Katzenwelpen durch Muttertiere zu verhindern, wurde früher die Isolation der trächtigen Mutter zwei Wochen vor Geburt und ein möglichst frühes Absetzen der Welpen im Alter von vier bis sechs Wochen empfohlen (ADDIE und JARRETT, 1992). In einer Studie mit Katzenwelpen von experimentell infizierten Müttern konnte keine Virusausscheidung vor der neunten Lebenswoche festgestellt werden (PEDERSEN et al., 2008). Allerdings zeigte eine Studie aus der Schweiz, dass Katzenwelpen ab einem Alter von zwei Wochen bereits FCoV ausscheiden können (LUTZ et al., 2002).

Bei einigen Tieren wurde FCoV mittels Immunfluoreszenz in konjunktivalen Epithelzellen aus Abstrichen der Nickhaut dargestellt sowie aus Speichel isoliert (HOK, 1989; ADDIE und JARRETT, 2001; DESMARETS et al., 2016). Bei 10 % der infizierten Katzen mit Virusausscheidung im Kot wurde virale RNA mittels RT-PCR auch im Speichel nachgewiesen (ADDIE und JARRETT, 2001). Interessanterweise wurde auch bei 4 % der Katzen ohne Virusausscheidung im Kot FCoV im Speichel festgestellt (ADDIE und JARRETT, 2001). Die Ausscheidung über den Speichel erfolgte überwiegend in der frühen Phase der Infektion (STODDART et al., 1988; ADDIE und JARRETT, 2001). Auch eine mögliche Ausscheidung von FCoV über den Urin bei Vorliegen einer Niereninfektion wird als möglich erachtet (HORA et al., 2013).

Eine transplazentare Übertragung scheint generell nicht vorzukommen. Ein Verdacht diesbezüglich wurde einmalig in den achtziger Jahren geäußert. In dieser Studie wurde eine transplazentare Übertragung in Betracht gezogen, da mehrere

Welpen eines Muttertieres an FIP verstarben. Das Muttertier selbst hatte jedoch keine Anzeichen für FIP (PASTORET und HENROTEAUX, 1978). Eine transplazentare Übertragung wurde daher nie sicher nachgewiesen.

In Haushalten mit FCoV-infizierten Katzen traten Reproduktionsstörungen, wie verringerte Fertilität und Aborte, auf (PEDERSEN, 2009). Um eine mögliche venerische Übertragung von FCoV nachzuweisen, wurden Sperma, Hodengewebe, Vollblut und Serum von 46 unkastrierten Katern mittels RT-PCR auf FCoV untersucht (STRANIERI et al., 2019). In den gewonnenen 17 Spermaproben wurde kein FCoV nachgewiesen. Eine venerische Übertragung über Samenflüssigkeit wird damit als sehr unwahrscheinlich angesehen (STRANIERI et al., 2019).

1.4. Resistenz gegen feline Coronaviren

Es wird diskutiert, ob Katzen eine Resistenz gegen FCoV aufweisen können. So wurde bei 2,9 % der Katzen, die nachweislich mit FCoV-infizierten Tieren in Kontakt kamen, keine Virusausscheidung beobachtet (ADDIE und JARRETT, 2001). Die Grundlage dieser Resistenz ist bisher aber nicht ausreichend geklärt.

Von einer Prädisposition mancher Katzen für die Infektion mit FCoV und die Entwicklung von FIP hingegen wurde mehrfach berichtet (ROHRBACH et al., 2001; BELL et al., 2006a; PESTEANU-SOMOGYI et al., 2006; WORTHING et al., 2012). In einer australischen Studie hatten Katzen bestimmter Rassen, wie Britisch Kurzhaar, Burma und Cornish Rex, signifikant höhere mediane FCoV-Antikörpertiter im Serum als Europäisch-Kurzhaar-Katzen, Perser und Bengalen (BELL et al., 2006b). Eine Langzeitstudie aus den USA fand eine Prädisposition für FIP unter anderem bei Abessinern, Bengalen, Ragdolls und Rexkatzen, wohingegen z. B. Katzen der Rassen Perser, Russisch Blau und Siamesen kein erhöhtes Risiko aufwiesen (PESTEANU-SOMOGYI et al., 2006). Eine an Birmakatten durchgeführte genomweite Assoziationsstudie (genome-wide association study, GWAS) fand Hinweise auf eine genetische Prädisposition für FIP (GOLOVKO et al., 2013). Die Prädisposition von Rassekatzen, FIP zu entwickeln, könnte am genetisch reduzierten Genpool liegen, aus dem sich Züchter bedienen, und einer damit einhergehenden erhöhten Anfälligkeit des Immunsystems für Pathogene (PESTEANU-SOMOGYI et al., 2006).

In nachfolgenden Studien wurden die Genome von Katzen, welche mit wenig-pathogenem FCoV infiziert waren und Katzen mit FIP untersucht. Hierbei wurden

Polymorphismen im Tumornekrosefaktor- α -(TNF- α)-Gen sowie im CD209-Gen, welches für den Rezeptor fDC-Sign kodiert, gefunden und ein Zusammenhang mit der Entstehung einer FIP angenommen (WANG et al., 2014). Polymorphismen einzelner Nukleotide (single nucleotide polymorphisms, SNP) im feline Interferon- γ -Gen könnten ebenfalls Einfluss auf die mögliche Entstehung einer FIP nehmen (HSIEH und CHUEH, 2014). In beiden Studien wurden sowohl Polymorphismen, die FIP begünstigen, als auch solche, die eine Resistenz gegen FIP bewirken, nachgewiesen. Mittels eines neu entwickelten Tests soll auf die genannten Genvariationen untersucht und damit eine Zucht von „FIP-resistenten“ Katzen ermöglicht werden (ANIMALABS, 2016). Dieser Gentest ist allerdings bislang noch nicht validiert. Die selektive Zucht mit Katzen, die einer experimentellen Infektion mit FIP-auslösendem FCoV gegenüber resistent waren, führte paradoxerweise zudem bei den Nachkommen zu einer verringerten Überlebensrate bei intraperitonealer Infektion mit FIP-auslösendem FCoV (PEDERSEN et al., 2016).

2. Pathogenese der feline infektiösen Peritonitis

Im Jahre 1966 wurde in den USA erstmals eine tödliche Erkrankung bei Feliden beschrieben, die vor allem junge Tiere bis zu einem Alter von zwei Jahren betraf und mit hochgradiger Peritonitis und Aszites einherging (WOLFE und GRIESEMER, 1966). Kurz darauf wurde der virale Ursprung der Erkrankung entdeckt (ZOOK et al., 1968).

2.1. Entstehung mutierter feline Coronaviren

Über die Entstehung von FIP existieren zwei verschiedene Theorien. Zum einen wird eine Mutation des wenig-pathogenen FCoV in der Katze zum FIP-auslösenden Virus propagiert (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998), zum anderen die parallele Existenz zweier unterschiedlich pathogener FCoV-Stämme angenommen (DYE und SIDDELL, 2007).

Bereits in den 80er Jahren wurde über die enge genetische Verwandtschaft eines wenig-pathogenen FCoV und FCoV bei Tieren mit FIP berichtet (PEDERSEN et al., 1981a). In darauffolgenden Studien wurde die Hypothese der internen Mutation des wenig-pathogenen FCoV zu FIP-auslösendem Virus aufgestellt. Katzen mit und ohne Infektion mit dem feline Immunschwächevirus (FIV) wurden mit einem FCoV-Stamm, gewonnen aus dem Kot von Katzen ohne FIP, oral infiziert

(POLAND et al., 1996). Innerhalb von acht bis zehn Wochen p. i. zeigten zwei Tiere der FIV-Gruppe Anzeichen einer FIP. Isoliertes FCoV aus den Läsionen der Katzen mit FIP besaß eine hohe genetische Übereinstimmung mit dem vorher oral verabreichten FCoV. Außerdem war das isolierte Virus in der Lage, bei intraperitonealer Inokulation in SPF-Katzen FIP hervorzurufen (POLAND et al., 1996). Eine weitere Studie untersuchte FCoV-Paare aus Kot und Gewebe von gesunden und an FIP erkrankten Katzen in derselben Umgebung und fand eine hohe genetische Übereinstimmung innerhalb der FCoV-Stämme (VENNEMA et al., 1998). Im Genom der FIP-auslösenden Stämme wurden zudem Deletionen und Punktmutationen gefunden, die in den korrespondierenden FCoV-Stämmen der gesunden Katzen nicht festgestellt werden konnten. Diese Beobachtungen legten eine gemeinsame Abstammung nahe (VENNEMA et al., 1998).

Gegensätzliche Beobachtungen wurden jedoch in einer späteren Studie gemacht. So ergab die Analyse der strukturellen und akzessorischen Gene von zwei verschiedenen FCoV-Stämmen, isoliert aus Jejunum und Leber einer Katze mit FIP, identische Gensequenzen beider Viren (DYE und SIDDELL, 2007). Dies veranlasste die Autoren dazu, die Mutationshypothese in Frage zu stellen. Eine weitere Studie, in der multiple Gensegmente von FCoV, welche aus gesunden Katzen isoliert wurden, nicht mit den Gensegmenten von FCoV, welche aus Katzen mit FIP isoliert wurden, übereinstimmten, unterstützte diese Theorie (BROWN et al., 2009). Die FCoV von Katzen mit FIP zeigten genetische Sequenzen der M-Gene und 7b-Gene, die sich deutlich von denen bei asymptomatischen Katzen unterschieden. Es wurde postuliert, dass zwei unterschiedliche Virusstämme, ein avirulentes und ein virulentes FCoV, parallel in der Katzenpopulation zirkulieren („Zwei-Stämme-Theorie“) (BROWN et al., 2009).

Die „Zwei-Stämme-Theorie“ wurde später durch Analyse der M-Gene von 43 FCoV-Genomen, gewonnen aus Kotproben von gesunden, FCoV-positiven Tieren sowie Aszites und Gewebeproben von Tieren mit FIP, widerlegt (CHANG et al., 2011). In dieser Studie wurde ein paraphyletisches Muster der Nukleotidsequenzen der M-Gene der FCoV-Stämme beschrieben, was auf eine enge genetische Verwandtschaft hinwies. Weitere Studien bestätigten große genetische Ähnlichkeiten zwischen FCoV-Stämmen, isoliert aus Gewebe von Katzen mit FIP und Kot von asymptomatischen Katzen (PEDERSEN et al., 2009; PEDERSEN et al., 2012b; BARKER et al., 2013). Dies untermauerte die bereits früher vermutete

„internal mutation hypothesis“, laut derer in der Katze selbst die Mutation des wenig-pathogenen FCoV zum FIP-auslösenden FCoV stattfindet. Der exakte Ort, an dem die Mutation im Körper der Katze stattfindet, ist noch nicht bekannt, es handelt sich aber wahrscheinlich um Monozyten/Makrophagen (STODDART und SCOTT, 1989; KIPAR et al., 2010; PEDERSEN, 2014a). Auch sind verschiedene Mutationen im Genom des FCoV beschrieben, welche mit dem Wechsel des Pathotyps in Zusammenhang gebracht werden (CHANG et al., 2012; LICITRA et al., 2013). Im Folgenden wird ein Überblick über mögliche Mutationen im Zusammenhang mit der Entstehung von FIP gegeben. In Abbildung 3 ist der schematische Aufbau des FCoV-Genoms dargestellt.

2.1.1. Mutationen im Spike-Gen

Da das S-Protein, wie zuvor beschrieben, entscheidend für die erfolgreiche Infektion von Wirtszellen mit FCoV ist, spielen Mutationen im S-Gen mit anschließender Veränderung des S-Proteins als Ursache für den Wechsel des viralen Zelltropismus wahrscheinlich eine große Rolle in der Pathogenese der FIP (ROTTIER et al., 2005; CHANG et al., 2012). Erste Hinweise diesbezüglich gab es bereits 1998, als Deletionen im S-Gen zweier FCoV-Stämme von Katzen mit FIP im Vergleich zu FCoV-Stämmen von Katzen ohne FIP aus demselben Habitat gefunden wurden (VENNEMA et al., 1998). Im Jahr 2005 wurde der membrannaher Bereich der S2-Domäne von FCoV als ausschlaggebend für den Tropismus des FIP-auslösenden Virus für Makrophagen benannt (ROTTIER et al., 2005).

Im Jahr 2012 wurden zwei Aminosäure-Substitutionen im Bereich des S-Proteins beschrieben, mittels derer in über 95% der Fälle wenig-pathogenes von FIP-auslösendem FCoV unterschieden werden konnte (CHANG et al., 2012). Dazu wurde das Genom sowohl von 118 FCoV-Stämmen aus Organproben und Aszites von Katzen mit FIP als auch von 183 FCoV-Stämmen aus Kot von gesunden Katzen sequenziert. Punktmutationen im Bereich der Nukleotide 23531 und 23537 im Spike-Gen von FCoV führten zu den Aminosäuresubstitutionen im S-Protein. Während sich bei allen nicht-mutierten FCoV das Nukleotid Adenin an Position 23531 befand, war bei 92 % der untersuchten mutierten FCoV an dieser Stelle Thymin oder Cytosin zu finden. Bei 4 % der mutierten FCoV befand sich an Stelle 23537 das Nukleotid Guanin, während bei den nicht-mutierten FCoV ausschließlich Thymin vorhanden war. Folge dieser Mutationen waren die Aminosäuresubstitutionen Methionin zu Leucin an Position 1058 sowie Serin zu

Alanin an Position 1060 des Spike Proteins (CHANG et al., 2012).

Eine weitere Studie untersuchte den von der Protease Furin spaltbaren Bereich zwischen der S1- und S2-Domäne des Spike-Proteins. Dabei wurde FCoV sowohl aus Fäzes von asymptomatischen Katzen als auch aus Gewebe von an FIP erkrankten Tieren gewonnen. Hierbei konnte eine Korrelation zwischen mindestens einer Substitution im S1/S2-Bereich des Spike-Proteins mit dem Auftreten von FIP beobachtet werden. Diese Substitution(en) führten mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Veränderung der proteolytischen Spaltung des S1/S2-Bereiches und damit möglicherweise zu einer Änderung des Zelltropismus der FCoV. Dieselbe Region war bei FCoV von asymptomatischen Katzen hingegen hoch konserviert (LICITRA et al., 2013).

Allerdings wurde die These, die genannten Aminosäure-Substitutionen im Spike-Protein seien verantwortlich für die Entstehung von FIP, inzwischen wieder in Frage gestellt. Ursache dafür ist der Nachweis der Aminosäuresubstitution M1058L nicht nur bei FCoV von Katzen mit FIP, sondern auch in Organproben von Katzen ohne FIP (PORTER et al., 2014; BARKER et al., 2017). Damit stellt sich die Frage, ob die Substitution lediglich die systemische Verbreitung von FCoV ermöglicht und somit nicht unbedingt ursächlich für FIP ist (PORTER et al., 2014).

2.1.2. Mutationen im open reading frame 3c

1998 wurden erstmals Mutationen im ORF-3c-Gen bei FCoV von Katzen mit FIP gefunden und als Ursache für die Entstehung von FIP diskutiert. Dabei handelte es sich um sogenannte „nonsense“-Mutationen, die entweder eine verfrühte Termination der Translation des Leserasters bewirkten oder zu einem Shift in ein anderes Leseraster führten, welches kurz darauf endete. Das Resultat war in beiden Fällen ein verkürztes 3c-Protein (VENNEMA et al., 1998).

Diese Beobachtungen wurden in weiteren Studien bestätigt, in denen Mutationen in Form von Insertionen und Punktmutationen in Kombination mit Deletionen im ORF-3c-Gen ausschließlich bei Katzen mit FIP und nicht bei Katzen ohne FIP gefunden wurden (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; BANK-WOLF et al., 2014). Allerdings zeigten weitere Studien auch bei Katzen mit FIP FCoV mit intaktem ORF-3c-Gen auf, weswegen Mutationen in diesem Bereich als alleiniger Auslöser von FIP ausgeschlossen wurden (VENNEMA et al., 1998; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012a; BANK-WOLF et al., 2014; BORSHENSKY und

REINACHER, 2014). Stattdessen wurde ein intaktes 3c-Gen als Voraussetzung für eine erfolgreiche Replikation im Darmtrakt postuliert, da aus Kot isolierte FCoV-Stämme immer ein intaktes ORF-3c-Gen aufwiesen, während FCoV außerhalb des Magen-Darm-Traktes kein intaktes ORF-3c-Gen hatten (CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012a). Allerdings kann die Replikation von FCoV mit trunkiertem ORF-3c-Gen im Gastrointestinaltrakt nicht vollständig ausgeschlossen werden, da diese Mutation auch bei FCoV im Kot nachgewiesen wurde (PEDERSEN et al., 2009; HSIEH et al., 2013). In einer 2016 veröffentlichten Studie wurde die Replikation von FCoV mit trunkiertem 3c-Gen im Dickdarm einer Katze bestätigt (HORA et al., 2016). Mutationen im 3c-Gen können damit nicht allein für die Entstehung von FIP verantwortlich sein.

2.1.3. Mutationen im open reading frame 7b

Auch im Bereich des ORF 7a und ORF 7b des FCoV-Genoms wurden Mutationen gefunden. Im Jahr 1995 wurde die Nukleotidsequenz des ORF-7b-Gens bei neun FCoV-Stämmen ermittelt. Dabei wurden Deletionen im ORF-7b-Gen bei *in vitro* gezüchteten FCoV-Stämmen beobachtet, während dies bei FCoV von Katzen mit und ohne FIP nicht der Fall war. Deletionen im ORF-7b-Gen gingen zudem mit einem Verlust der Virulenz des Virus einher (HERREWEGH et al., 1995a). FIP-auslösende Stämme mit Deletionen im ORF-7b-Bereich besitzen keine Infektiosität für Makrophagen/Monozyten (DEDEURWAERDER et al., 2013). Damit scheint ein intaktes ORF-7b-Gen eine wichtige Rolle bei der Replikation des Virus in Makrophagen zu spielen (DEDEURWAERDER et al., 2013). Da jedoch Deletionen im ORF-7b-Gen sowohl bei FCoV von Katzen ohne FIP (VENNEMA et al., 1992) als auch bei FCoV von Katzen mit FIP gefunden wurden (LIN et al., 2009), sind Mutationen im ORF-7b-Gen nicht der alleinige Auslöser für FIP.

2.1.4. Weitere Mutationen

Im ORF-3a-Gen in FCoV von Katzen mit FIP wurden Punktmutationen nachgewiesen, welche ein verkürztes Translationsprodukt des 3a-Proteins zur Folge hatten (BANK-WOLF et al., 2014). Auch im ORF-3b-Gen bei Katzen mit FIP wurden Nukleotid-Deletionen nachgewiesen, die in verkürzten 3b-Polypeptiden resultierten. FCoV-Stämme von Katzen ohne FIP wiesen dagegen keine Deletionen auf (BANK-WOLF et al., 2014). Eine Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen Deletionen im ORF-7a-Gen und FIP (KENNEDY et al.,

2001). Dies konnte in einer späteren Veröffentlichung jedoch nicht bestätigt werden (BANK-WOLF et al., 2014). Eine Deletion im M-Gen wurde lediglich bei 2 von 32 FCoV-Stämmen von Katzen mit FIP nachgewiesen und scheint damit keine große Relevanz zu haben (PEDERSEN et al., 2012b). Das N-Gen spielt, bisherigen Studien zufolge, keine Rolle beim Wechsel der Pathotypen (VENNEMA et al., 1998; BATTILANI et al., 2010).

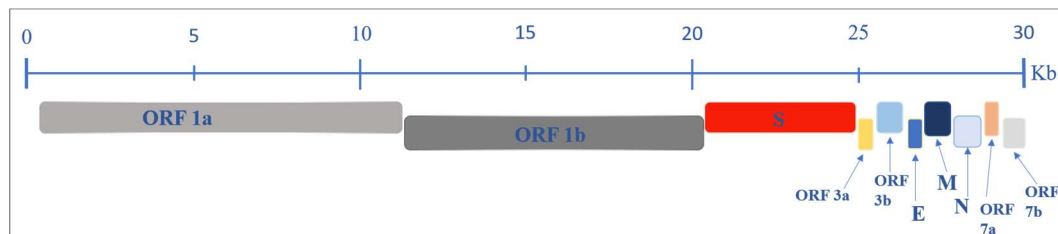


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Genoms feliner Coronaviren, modifiziert nach Kipar und Meli (KIPAR und MELI, 2014); ORF: open reading frame (offener Leserahmen), Kb: Kilobasen, e: envelope (Hülle), m: Membran, n: Nukleokapsid, s: Spike

2.2. Immunpathogenese

Der Zeitpunkt zwischen der Mutation des Virus und der Erscheinung klinischer Symptome ist variabel, wobei mit einer Zeitspanne von wenigen Wochen bis hin zu zwei Jahren gerechnet werden muss (HARTMANN, 2005). Dass die klinischen Symptome bei FIP ihren Ursprung in immunologischen Reaktionen haben, wurde schon früh diskutiert (HORZINEK und OSTERHAUS, 1979a; PEDERSEN und BOYLE, 1980; WEISS et al., 1980; WEISS und SCOTT, 1981a). Man ging früher davon aus, dass das Immunsystem mit einer vorwiegend zellulären Abwehr die Ausbreitung des Virus für eine gewisse Zeit lokal begrenzen kann. Überwiegt jedoch die humorale Immunantwort, kommt es unter anderem zu den typischen Körperhöhlenergüssen (PEDERSEN, 2014a). Auftretende morphologische Veränderungen sind granulomartige Herde mit und ohne ausgedehnter Nekrose (KIPAR et al., 1998). Sie können diverse Körperorgane inklusive des Auges (SLAUSON und FINN, 1972; GELATT, 1973; ANDREW, 2000) und des zentralen Nervensystems (ZNS) (FOLEY et al., 1998; NORRIS et al., 2005) betreffen und manifestieren sich sowohl mit als auch ohne Entwicklung von proteinreichem Erguss (PEDERSEN, 2009). Histologisch zeigt sich eine granulomatöse Phlebitis mit venöser und perivenöser Infiltration von überwiegend Makrophagen/Monozyten sowie vereinzelt Neutrophilen, Lymphozyten und

Plasmazellen (MONTALI und STRANDBERG, 1972; KIPAR et al., 1998; KIPAR et al., 2005; PEDERSEN, 2014a). Die Entzündung ist auf Venen kleinen und mittleren Durchmessers beschränkt (KIPAR et al., 2005). Monozyten/Makrophagen als dominierende Zellart im Entzündungsprozess emigrieren aus den Blutgefäßen, infiltrieren die Gefäßwand und/oder sammeln sich perivenös. Auch intravaskuläre Agglomerate wurden beobachtet (KIPAR et al., 2005). Entzündungszellen können sogar gelegentlich die Basallamina der Gefäßwand komplett ersetzen (KIPAR et al., 2005).

2.2.1. Virämie und Aktivierung von Makrophagen

Ursprünglich wurde angenommen, dass das wenig-pathogene FCoV nur die Enterozyten infiziert, in ihnen repliziert und den Gastrointestinaltrakt nicht verlässt (PEDERSEN et al., 1981a; PEDERSEN et al., 1984a), während FIP-auslösendes FCoV hingegen Makrophagen/Monozyten infiziert, in diesen repliziert und über die Blutzirkulation im Körper verbreitet wird (WEISS und SCOTT, 1981c; STODDART und SCOTT, 1989). Mittlerweile wurde FCoV allerdings auch in Makrophagen/Monozyten des peripheren Blutes bei klinisch gesunden Katzen nachgewiesen, sodass anzunehmen ist, dass sich auch wenig-pathogenes FCoV systemisch verbreiten kann (GUNN-MOORE et al., 1998; MELI et al., 2004; CAN-ŞAHNA et al., 2007; KIPAR et al., 2010).

Im Unterschied zu wenig-pathogenem FCoV ist FIP-auslösendes FCoV jedoch in der Lage, effizienter in Makrophagen/Monozyten zu replizieren (DEWERCHIN et al., 2005; ROTTIER et al., 2005). In einer experimentellen Studie war die Produktion von Virus in Makrophagen, die mit wenig-pathogenem FCoV infiziert wurden, bis zu 100-mal niedriger, verglichen mit Makrophagen, die mit FIP-auslösendem FCoV infiziert wurden (DEWERCHIN et al., 2005). Nur das FIP-auslösende FCoV konnte die Replikation in Makrophagen über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten und effizient weitere Wirtszellen infizieren (STODDART und SCOTT, 1989; DEWERCHIN et al., 2005). Auch *in vivo* zeigten Tiere mit FIP höhere virale Replikationsraten sowie eine höhere Viruslast im Gewebe, verglichen mit klinisch unauffälligen Tieren (PORTER et al., 2014; BARKER et al., 2017).

Damit kommen die Makrophagen/Monozyten als der Ort in Frage, an dem sich der Wechsel von nicht-mutiertem zu mutiertem Virus vollziehen könnte (PEDERSEN,

2014a). Virushaltige Makrophagen/Monozyten gelangen initial vom Gastrointestinaltrakt in regionales lymphatisches Gewebe, in dem eine weitere Vermehrung stattfindet (ANDREW, 2000), gefolgt von einer anschließenden Virämie (KIPAR et al., 2005). Dabei sind FCoV-positive Makrophagen/Monozyten vor allem in Gefäßen der Leptomeninx, Lunge und Nierenrinde sowie vereinzelt in Milz und Lymphknoten zu finden (WEISS und SCOTT, 1981a; KIPAR et al., 2005).

Die massive Auswanderung von Monozyten/Makrophagen wird unter anderem mit der vermehrten zellulären Produktion des Enzyms Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) in Verbindung gebracht. MMP-9 führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Basallamina durch Spaltung des darin enthaltenen Kollagens (KIPAR et al., 2005). Zusätzlich zu der auftretenden erhöhten Gefäßpermeabilität ist eine vermehrte Adhäsion der Monozyten untereinander und an den Endothelzellen Voraussetzung für die Emigration von Zellen in das umliegende Gewebe (OLYSLAEGERS et al., 2013). Intravaskuläre Monozyten sowie perivaskuläre Makrophagen in granulomatösen Herden zeigten eine hohe Expression des β 2-Integrin-CD18 auf der Zelloberfläche (KIPAR et al., 2005), ein Zeichen für die Aktivierung dieser Zellen (FERNANDEZ-SEGURA et al., 1996). Das β 2-Integrin-CD18 ist essentiell bei der Adhäsion der Monozyten/Makrophagen an die Endothelzellen und bei der Migration durch die Endothelzellen (ISSEKUTZ, 1995). Es bindet spezifisch an das intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ein Protein, welches von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird (BEVILACQUA, 1993). Des Weiteren produzieren Makrophagen/Monozyten bei Katzen mit FIP vermehrt die Zytokine Interleukin (IL)-1 (HASEGAWA und HASEGAWA, 1991) und TNF- α (TAKANO et al., 2009), welche die Adhäsion an Endothelzellen fördern (ISSEKUTZ, 1995) sowie eine vermehrte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 durch Endothelzellen bewirken (WEILL et al., 1995). TNF- α verlängert die Überlebenszeit der neutrophilen Granulozyten, indem es die natürlich eintretende Apoptose verzögert und damit zur Entstehung der granulomatösen Läsionen beiträgt (PALTRINIERI, 2008; TAKANO et al., 2009).

Aktivierte Makrophagen/Monozyten sind auch an der Entstehung von Körperhöhlenergüssen bei FIP beteiligt, indem sie vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) produzieren (TAKANO et al., 2011). Diese bewirken eine erhöhte Permeabilität der Endothelzellen (DVORAK et al., 1999). Dabei

korreliert die Menge an Ergussflüssigkeit mit der Höhe an VEGF im Plasma (TAKANO et al., 2011). Die Aktivierung der Makrophagen/Monozyten spielt somit eine zentrale Rolle bei der Entstehung von FIP-assoziiierter Vaskulitis und ist ein Schlüsselmoment bei der Entstehung der Erkrankung (KIPAR et al., 2005; KIPAR und MELI, 2014).

2.2.2. Immunreaktionen

Gelangen Antigene in den Körper, wird unterschieden zwischen einer spezifischen und einer nicht-spezifischen Immunantwort. Die spezifische Immunantwort besteht aus zwei Komponenten, der humoralen und der zellulären Immunantwort. In den B-Lymphozyten werden Antikörper produziert (humorale Immunantwort), um das fremde Antigen zu markieren und von speziell darauf ausgerichteten Zellen des Körpers zerstören zu lassen. Träger der zellulären Immunantwort sind die T-Lymphozyten, welche unter anderem direkt zur Zerstörung des Antigens befähigt sind (PARKIN und COHEN, 2001; TOMAR und DE, 2014). Erkrankt eine Katze an FIP, wird sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort beobachtet (PEDERSEN, 2009).

2.2.2.1. Humorale Immunantwort

Bei FIP funktioniert die von Antikörpern vermittelte Beseitigung infizierter Zellen nicht ausreichend, um eine Erkrankung abzuwehren (DEWERCHIN et al., 2005; DEWERCHIN et al., 2008; KIPAR und MELI, 2014), obwohl erkrankte Katzen hohe Antikörperspiegel haben (PEDERSEN, 1976; STODDART et al., 1988; KIPAR und MELI, 2014). Einige *in vitro*-infizierte Monozyten präsentierten zwar virales Antigen auf der Zelloberfläche und ermöglichten damit theoretisch eine Zelllyse (JACOBSE-GEELS und HORZINEK, 1983; DEWERCHIN et al., 2005). Allerdings fand *in vitro* bei Kontakt der membrangebundenen Antigene mit FCoV-spezifischen Antikörpern eine schnelle Internalisierung der Virusantigene in das Zytoplasma der Zelle statt, sodass eine Beseitigung der infizierten Monozyten nicht mehr möglich war (DEWERCHIN et al., 2006; DEWERCHIN et al., 2008). Dies war bei Zugabe eines unspezifischen Antikörpers oder eines anderen Mediums nicht spontan reproduzierbar (DEWERCHIN et al., 2006). In einer weiteren Studie mit *in vivo*-infizierten Zellen von Katzen mit FIP wurden sogar keinerlei Antigene auf der Zelloberfläche festgestellt (CORNELISSEN et al., 2007). Damit sind Antikörper nicht mehr in der Lage, infizierte Monozyten zu identifizieren und zu

beseitigen, da die Zellen aufgrund fehlender Virusantigene auf der Zelloberfläche für das Immunsystem unerkannt bleiben (CORNELISSEN et al., 2007, 2009).

Antikörper-produzierende Plasmazellen wurden sowohl in der Peripherie als auch in der nahen Umgebung von granulomartigen Läsionen bei Katzen mit FIP festgestellt (KIPAR et al., 1998). Sie entwickeln sich aus B-Zellen, welche die Granulome infiltrieren und die bis dahin vorherrschende Makrophagenpopulation ersetzen (KIPAR et al., 1998). Die genauen Auslöser für die Akkumulation von B-Zellen sowie die Transformation in Antikörper-produzierende Plasmazellen sind noch nicht bekannt (KIPAR et al., 1998). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass aktivierte Makrophagen Interleukin (IL)-6 produzieren (GOITSUKA et al., 1990), welches die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen bewirkt (HIRANO et al., 1986).

Der Produktion von Antikörpern bei FIP wird zum Teil eine kontraproduktive Wirkung zugeschrieben, da Antikörper die Aufnahme von Virus in die Wirtszelle beschleunigen können (STODDART und SCOTT, 1989; PEDERSEN, 2009). Entstandene Antigen-Antikörper-Komplexe werden dabei über eine durch fragment-crystalline-Rezeptoren (Fc-Rezeptoren) vermittelte Endozytose in Makrophagen aufgenommen (OLSEN et al., 1992). Dieser Prozess führte in experimentellen Studien zu einem schwereren und schnelleren Verlauf von FIP und wurde als „antibody-dependent enhancement“ (ADE) beschrieben (PEDERSEN und BOYLE, 1980; HOHDATSU et al., 1991a; OLSEN et al., 1992; HOHDATSU et al., 1998b; TAKANO et al., 2008).

Die bei FIP auftretende Vaskulitis wird oft als immunkomplex-medierte Hypersensitivitätsreaktion vom Typ III angesehen. Dies wird begründet mit der Feststellung von Antigen-Antikörperkomplexen im Blut, hohen Konzentrationen des Komplementfaktors C3 (C3) und einer Ablagerung von Antigen-Antikörperkomplexen in glomerulären Gefäßen (JACOBSE-GEELS et al., 1980, 1982). Zudem wurden virales Antigen, daran gebundenes Immunglobulin G (IgG), Fibrinogen und C3 in Läsionen bei Tieren mit experimentell induzierter FIP nachgewiesen (PEDERSEN und BOYLE, 1980; WEISS und SCOTT, 1981b). Allerdings sind weitere Kriterien einer immunkomplex-medierten Vaskulitis, wie die Beteiligung von Arterien und die zelluläre Dominanz von Neutrophilen, nicht erfüllt (KIPAR et al., 2005). Damit wird eine Hypersensitivitätsreaktion vom Typ III nicht als vorherrschender pathogener Mechanismus bei der Entstehung der FIP-

typischen Läsionen angesehen (KIPAR und MELI, 2014).

2.2.2.2. Zelluläre Immunantwort

Eine frühe effektive zelluläre Immunantwort auf die Entstehung einer FIP wird von vielen Autoren als essentieller Faktor für die Bestimmung des weiteren Verlaufs der Erkrankung angesehen (WEISS und COX, 1989; POLAND et al., 1996; DE GROOT-MIJNES et al., 2005). Ein Beispiel für die wichtige Rolle von T-Zellen für den Krankheitsverlauf ist die Infektion von Mäusen mit MHV. Dieses Virus ruft eine Erkrankung hervor, die vom Verlauf her FIP ähnelt. Bei immunkompetenten sowie B-Zell-defizienten Mäusen bleibt die Infektion auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt (KYUWA et al., 1998), wohingegen bei T-Zell-defizienten Tieren eine fulminant verlaufende, tödliche Erkrankung mit Peritonitis ausbricht (COMPTON et al., 2004). Gelingt es, mittels früher T-Zell-Reaktion die Virusvermehrung bei Katzen mit FIP einzuschränken, könnte dies den Krankheitsverlauf möglicherweise verzögern (DE GROOT-MIJNES et al., 2005).

T-Zellen als Träger der zellulären Immunantwort sind in sehr geringer Menge in FIP-typischen Läsionen verteilt (KIPAR et al., 1998). Bei Katzen mit FIP können im peripheren Blut, in der Milz und in Mesenteriallymphknoten kaum natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden, auch besitzen die NK-Zellen eine verminderte zytotoxische Funktion (VERMEULEN et al., 2013). Dies wird auf eine Apoptose von Lymphozyten in lymphatischem Gewebe bei Katzen mit FIP zurückgeführt (HAAGMANS et al., 1996; KIPAR et al., 2001; DEAN et al., 2003). Bei jungen erkrankten Katzen kommt es zudem zu einer Thymusinvolution oder sogar Atrophie des Organs (KIPAR et al., 2001). Als Ursache für den beobachteten Zellschwund wird eine Beteiligung von TNF- α vermutet; dies konnte bislang aber nur *in vitro* demonstriert werden (HAAGMANS et al., 1996). Eine weitere Studie zeigte die Apoptose von feline T-Zellen in einer Zellkultur in Anwesenheit von Aszites, Plasma und dem Überstand aus kultivierten Peritonealmakrophagen von Katzen mit FIP (TAKANO et al., 2007). Die Autoren fanden einen möglichen Zusammenhang zwischen der Apoptose der T-Zellen und der Anwesenheit von TNF- α , produziert von Peritonealmakrophagen und mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bei Katzen mit FIP. Auch *in vivo* wurde eine erhöhte Transkription von TNF- α in PBMC von Katzen mit FIP nach experimenteller Infektion beobachtet (KISS et al., 2004).

III. PUBLIKATION I

Detection of feline coronavirus mutations in paraffin-embedded tissues in cats with feline infectious peritonitis and controls

Laura Sangl¹

Kaspar Matiasek², Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Associate Member ECVN

Sandra Felten¹, Dr. med. vet.

Stefanie Gruendl¹, Dr. med. vet.

Michele Bergmann¹, Dr. med. vet.

Hans-Joerg Balzer³, Dr. rer. nat.

Nikola Pantchev³, Dr. med. vet.

Christian M. Leutenegger⁴, Dr. med. vet., Ph.D.

Katrin Hartmann¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine)

¹Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

²Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

³IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany

⁴IDEXX Laboratories, Inc., West Sacramento, USA

Journal of Feline Medicine and Surgery, veröffentlicht

Journal of Feline Medicine and Surgery 2019; 21: 133-42;

doi: 10.1177/1098612x18762883.



Original Article



Detection of feline coronavirus mutations in paraffin-embedded tissues in cats with feline infectious peritonitis and controls

Laura Sangl¹, Kaspar Matiasek², Sandra Felten¹, Stefanie Gründl¹, Michele Bergmann¹, Hans-Jörg Balzer³, Nikola Pantchev³, Christian M Leutenegger⁴ and Katrin Hartmann¹

Journal of Feline Medicine and Surgery
2018, Vol. 21(2) 133–142

© The Author(s) 2018

Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/1098612X18762883

journals.sagepub.com/home/jfms

This paper was handled and processed by the European Editorial Office (EFMO) for publication in JFMS



Abstract

Objectives The amino acid substitutions M1058L and S1060A in the spike protein of feline coronavirus (FCoV) have been postulated to be responsible for the development of the pathogenic feline infectious peritonitis virus (FIPV), which causes feline infectious peritonitis (FIP). The aim of the following study was to investigate the presence of mutated virus in tissue samples of cats with and without FIP.

Methods The study population consisted of 64 cats, 34 of which were diagnosed with FIP and 30 control cats. All cases underwent autopsy, histopathology and immunohistochemistry (IHC) for FCoV. Furthermore, a genotype-discriminating quantitative reverse transcriptase PCR (RT-qPCR) was performed on shavings of paraffin-embedded tissues to discriminate between cats with FIP and controls, and the sensitivity and specificity of this discriminating RT-qPCR were calculated using 95% confidence intervals (CIs).

Results Specificity of genotype-discriminating RT-qPCR was 100.0% (95% CI 88.4–100.0), and sensitivity was 70.6% (95% CI 52.5–84.9). In cats with FIP, 24/34 tested positive for FIPV. In samples of three control cats and in seven cats with FIP, FCoV was found, but genotyping was not possible owing to low FCoV RNA concentrations. Out of the positive samples, 23 showed the amino acid substitution M1058L in the spike protein and none the substitution S1060A. One sample in a cat with FIP revealed a mixed population of non-mutated FCoV and FIPV (mixed genotype). For one sample genotyping was not possible despite high viral load, and two samples were negative for FCoV.

Conclusions and relevance As none of the control animals showed FCoV amino acid substitutions previously demonstrated in cats with FIP, it can be presumed that the substitution M1058L correlates with the presence of FIP. FCoV was detected in low concentration in tissues of control animals, confirming the ability of FCoV to spread systemically. The fact that no negative controls were included in the IHC protocol could potentially lead to an underestimation of the sensitivity of the RT-qPCR.

Accepted: 7 February 2018

Introduction

Feline infectious peritonitis (FIP) predominantly affects young cats, with those <1 year of age being especially prone to developing this fatal disease.¹ FIP is caused by a certain genotype of feline coronavirus (FCoV). FCoV exists in two genotypes: feline enteric coronavirus (FECV), which is benign but very common, whereas the sporadically appearing FIP virus (FIPV) triggers a lethal immune response in affected cats.²

¹Clinic of Small Animal Medicine, LMU, Munich, Germany

²Section of Clinical and Comparative Neuropathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU, Munich, Germany

³IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany

⁴IDEXX Laboratories, West Sacramento, CA, USA

Corresponding author:

Laura Sangl, Clinic of Small Animal Medicine, LMU, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany
Email: laura.sangl@gmx.de

FIPV develops out of FECV within infected cats.^{3,4} Two mutations in nucleotide 23531 and nucleotide 23537 in the spike (S) gene, resulting in the substitution of a methionine to leucine codon at position 1058 (M1058L) and a substitution of a serine to alanine codon at position 1060 (S1060A) of the spike protein, respectively, have been considered responsible for the genotype switch and for an enhanced macrophage tropism.^{5,6} However, other mutations have also been hypothesised to play a role, such as changes in the 3c, 7a, 7b gene,^{7,8} or, more recently, in the furin cleavage site in the region between receptor-binding (S1) and fusion (S2) domains of the spike gene, enhancing virus uptake by macrophages.³

Production of cytokines via infected macrophages and activation of neutrophils result in histological lesions typical of FIP,⁹ consisting of granulomas with focal and perivascular lymphoplasmocytic infiltrates and pyogranulomatous-necrotising vasculitis.¹⁰ Identification of such histopathological lesions with immunohistochemical (IHC) detection of FCoV antigen in tissue macrophages is considered the gold standard of FIP diagnosis.¹¹ Thus, organ biopsies for histopathology and IHC are necessary for a definitive diagnosis, which have to be obtained through invasive procedures.

Recently conducted studies on the presence of FCoV with a mutation in the region of the S gene have delivered contradictory results. A group in the Netherlands obtained full genome sequence data from FCoV strains in the faeces of healthy cats and tissues or ascites of cats with FIP, and found that the two gene mutations in nucleotide 23531 and nucleotide 23537 distinguished FIPV from FECV in >95% of all cases.⁵

Another study conducted in England included 45 tissue samples from 27 cats with FIP and 41 tissue samples obtained from 16 control animals (excluding faecal samples). Out of all of the tissue samples from cats with FIP, 43/45 samples were positive for FCoV using quantitative reverse transcriptase PCR (RT-qPCR), with 39 samples showing the leucine codon (M1058L), which was identified using pyrosequencing. Of the 41 tissue samples from control animals, nine were positive for FCoV, with eight samples presenting the leucine codon at position 1058. As the leucine codon (M1058L) in the FCoV spike protein had previously only been found in cats with FIP, this questions the hypothesis that the M1058L substitution only occurs in cats with FIP and is responsible for the genotype switch. Thus, the authors of the latter study concluded that the M1058L substitution would only be an indicator for the ability of FCoV to spread systemically from the gastrointestinal tract and not for confirming FIP.

It still remains under debate whether the M1058L and S1060A substitutions in the spike protein are responsible for the genotype switch or not. Therefore, it was the aim of the present study to assess the presence of mutated virus in tissues of a large and well-defined population of cats with and without FIP.

Materials and methods

Animals

The study included 64 cats, 34 of which were diagnosed with FIP and 30 were classified as control animals. All cats were presented to the Clinic of Small Animal Medicine or were submitted directly to the Institute of Veterinary Pathology for autopsy between 2012 and 2015. Only cats in which a full-body examination, as well as IHC staining for FCoV antigen in tissue macrophages was performed, were included. Cats were classified as having FIP if they demonstrated macroscopic, as well as histological, changes consistent with FIP and a positive IHC staining of tissue samples (Figure 1, Table 1). The main criteria for inclusion of control cats were the possibility to perform a full-body necropsy and presence of at least one clinical problem indicative of FIP, such as ascites, thoracic effusion, pericardial effusion, dyspnoea, icterus, fever, glomerulonephritis, neurological signs or uveitis (Table 2). Only cats in which negative IHC staining for FCoV antigen in organ tissue macrophages was obtained were included in the control group. The animals were not age-matched. Every cat that was presented to the Clinic of Small Animal Medicine and that fulfilled the inclusion criteria was included into the study. The study was approved by the ethical committee of the Centre for Clinical Veterinary Medicine of LMU (reference number 52-27-07-2015).

IHC

In all cats, IHC was performed to diagnose or exclude FIP as described previously.¹² As primary antibody,

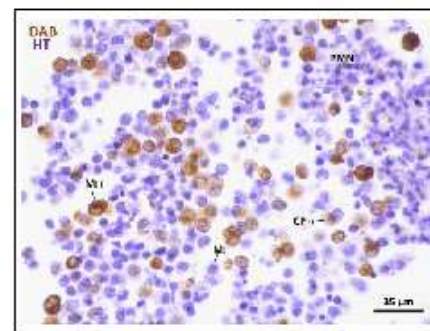


Figure 1 Immunohistochemical staining for feline coronavirus antigen using chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB; brown) and haematoxylin (HT; violet) as counterstain. Note immunopositive (M(+)) vs immunonegative (M(-)) macrophages and those engulfing immunopositive cells via cytophagocytosis (CP(+)). Apart from macrophages, the infiltrate contains some lymphocytes and aggregates of polymorphonuclear neutrophils (PMN).

anti-FCoV mouse monoclonal IgG2A (FIPV3-70; Linaris) was used. Samples were then left to incubate for at least 17 h overnight at 4°C and treated on the second day with the secondary antibody (biotinylated goat anti-mouse; Dako). An avidin-biotinylated horseradish peroxidase (HRP)-complex (ABC, Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories) was applied to bind to the biotin of the secondary antibody, presenting the biotin-bound HRP for the final step. 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; pH 7.0; Kem-En-Tec Diagnostics) was combined with 3% hydrogen peroxide to catalyse the oxidation of DAB to a visibly brown chromogen. To rule out staining errors, positive tissue controls were part of every protocol, but no negative controls were included.

RT-qPCR to discriminate the FCoV genotype

Tissue samples of all cats were obtained post-mortem. Tissue samples were elected retrospectively, including samples of cats with FIP from previous studies,^{12,13} whereas processing and investigation was undertaken prospectively using manufactured paraffin blocks. Samples of various tissues had been collected of each animal during necropsy and subsequently fixed in paraffin blocks (Tables 3 and 4). The samples for RT-qPCR were then shaved off each block with a thickness of 16–32 µm per sample. As one block and therefore one shaved sample could contain several different samples of tissues, a differentiation of the tissues was not possible. Five samples from each animal were then pooled for RT-qPCR analysis, yielding only one result per animal.

Genotype-discriminating RT-qPCR was performed blinded with regard to the underlying diagnoses. Total nucleic acid was extracted from paraffin-embedded tissue samples by a QIAamp DNA Blood BioRobot MDx Kit on an automated Qiagen platform according to the manufacturer's instructions with slight modifications (IDEXX Laboratories). In order to determine the presence of FCoV and to discriminate the genotype, three real-time PCR assays were performed in parallel as single-plex reactions (IDEXX Laboratories). The first real-time PCR was based on the 7b gene to detect FCoV RNA and quantify viral burden;¹⁴ the other two real-time PCRs were targeting the M1058L and S1060A single nucleotide polymorphisms (SNPs) described before to correlate with the occurrence of the lethal FIPV genotype.⁵ These two PCR assays allow typing of an FCoV strain based on the presence (FIPV) or absence (FECV) of one of the two SNPs within the fusion peptide of the spike gene. Briefly, highly specific hydrolysis probes were designed to either detect the mutation at position 3174 or 3180 (corresponding to M1058L and S1060A) or wild-type sequences by using an allelic discrimination real-time PCR approach. Fluorescence intensities were used to calculate ratios of the probes detecting the mutation or the wild-type sequences. FIPV was assigned if the mutation probe exceeded a two-fold higher fluorescence than the wild-type probe.

Genotype-discriminating real-time PCR was run with six quality controls, including: (1) PCR-positive controls (quantitatively; using synthetic DNA covering the real-time PCR target region; Integrated DNA Technologies); (2) PCR-negative controls (PCR-grade nuclease-free water); (3) negative extraction controls (extraction positions filled with nucleic acid-free water only); (4) RNA pre-analytical quality control targeting feline ssr rRNA (18S rRNA) gene complex; (5) a swab-based environmental contamination monitoring control; and (6) spike-in internal positive control (using lambda phage DNA). These controls assessed the functionality of the PCR test protocols (1), for the absence of contamination in the reagents (2) and laboratory (5), absence of cross-contamination during the extraction process (3), quality and integrity of the RNA as a measure of sample quality (4), and absence of PCR inhibitory substances as a carry-over from the sample matrix (6). The analytical, as well as the clinical, specificity of the RT-qPCR was confirmed by re-sequencing amplification products with dedicated sequencing primers located 5' and 3' to those used in the routine RT-PCR protocol. For Cp values regarding the endogenous quality control (18S rRNA gene) as well as the detection of FCoV RNA (7b gene), see the supplementary material.

Corresponding to the outcome of the discriminating RT-qPCR, six different results were obtained (Table 5).

- 1 Genotype FIPV: the mutated genotype was detected at much higher levels than the wild-type in the sample of paraffin-embedded tissues.
- 2 Genotype FECV: FCoV without the mutation was found in the sample.
- 3 Mixed genotype: mutated as well as non-mutated FCoV RNA was detected.
- 4 Below limit of determination (BLD): FCoV RNA was detected at low viral burden, with the mutation assays not yielding a result.
- 5 Indeterminate (IND): FCoV RNA was found in high concentration, with the mutation assays not yielding a result.
- 6 Negative: no FCoV RNA was detected.

Statistical evaluation

Samples were evaluated for the presence of mutated and non-mutated virus. In order to define parameter uncertainty, a confidence interval (CI) of 95% was calculated. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were determined. The overall accuracy was calculated as the sum of true positive and true negative test results divided by the total number of test results. Sample results classified as BLD or IND were defined as negative in statistical analysis, owing to the inability to determine the underlying genotype. Samples containing a mixed genotype were regarded as positive.

Table 1 Presence of effusion, results of the genotype-discriminating RT-qPCR, amount and thickness of shavings per block in 34 cats with feline infectious peritonitis (FIP)

Cat	Presence of effusion due to FIP	Major additional clinical problems	Amount and thickness of shavings per block (μm)	Result of genotype-discriminating RT-qPCR
1	Ascites	Anorexia, lethargy	5 × 16	BLD
2	Ascites and fluid in scrotal cavity	Anaemia, icterus	5 × 16	BLD
3	Ascites	Fever, icterus	5 × 16	FIPV, M1058L
4	Ascites	Anaemia, diarrhoea, icterus	5 × 32	FIPV, M1058L
5	Pericardial effusion	Anaemia	5 × 16	FIPV, M1058L
6	Ascites, thoracic effusion	Dyspnoea	5 × 16	BLD
7	No effusion	Fever, hyperglobulinaemia	5 × 16	FIPV, M1058L
8	Ascites	Anaemia, hyperglobulinaemia	5 × 16	FIPV, M1058L
9	Ascites	Dyspnoea, fever, icterus	5 × 16	BLD
10	Ascites	Hyperglobulinaemia, icterus	5 × 16	FIPV, M1058L
11	Ascites	Anaemia, icterus	5 × 16	FIPV, M1058L
12	Ascites	Anorexia, fever, icterus	5 × 16	FIPV, M1058L
13	No effusion	Anaemia, fever, hyperglobulinaemia	5 × 16	FIPV, M1058L
14	Ascites	Anaemia, fever, hyperglobulinaemia, uveitis	5 × 16	FIPV, M1058L
15	Ascites, pericardial effusion	Anaemia, hyperglobulinaemia, icterus	5 × 16	FIPV, M1058L
16	Ascites	Fever, icterus, cachexia	5 × 16	BLD
17	Ascites, thoracic effusion	Anaemia, uveitis	5 × 16	FIPV, M1058L
18	Ascites	Anaemia, hyperglobulinaemia, icterus	5 × 16	FIPV, M1058L
19	Ascites	Fever, lethargy	5 × 16	Negative
20	No effusion	Anaemia, dyspnoea, hyperglobulinaemia, icterus	5 × 16	Negative
21	Ascites	Anaemia, icterus	5 × 32	FIPV, M1058L
22	Pleural, pericardial effusion	Fever, uveitis	5 × 32	FIPV, M1058L
23	Pleural, pericardial effusion	Anaemia, icterus	5 × 32	FIPV, M1058L
24	Thoracic effusion	Anaemia, dyspnoea, fever	5 × 32	FIPV, M1058L
25	Ascites	Anaemia, fever, icterus	5 × 32	IND
26	Ascites	Anaemia, icterus, hyperglobulinaemia, neurological signs	5 × 32	FIPV, M1058L
27	Ascites	Anaemia, dyspnoea, fever, hyperglobulinaemia	5 × 32	FIPV, M1058L
28	Ascites	Weight loss, icterus	5 × 32	FIPV, M1058L
29	Ascites	Icterus, lethargy, weight loss	5 × 32	BLD
30	Ascites	Anaemia, icterus	5 × 32	Mixed genotype
31	Ascites	Anorexia, fever	5 × 32	FIPV, M1058L
32	Ascites	Diarrhoea, icterus, lethargy	5 × 32	BLD
33	Ascites	Anaemia, fever	5 × 32	FIPV, M1058L
34	Pleural and pericardial effusion	Dyspnoea, neurological signs	5 × 32	FIPV, M1058L

BLD = feline coronavirus (FCoV) present but below limit of detection; FIPV = feline infectious peritonitis virus; IND = FCoV present, but indeterminate strain variations

Table 2 Diagnosis, clinical presentation, results of the genotype-discriminating RT-qPCR and amount and thickness of shavings per block in 30 control cats

Cat	Diagnosis at necropsy	Major clinical problems	Amount and thickness of shavings per block (µm)	Result of genotype-discriminating RT-qPCR
1	Globoid cell leukodystrophy	Pericardial effusion, tetraplegia, head tremor	5 × 32	Negative
2	Lymphocytic meningoencephalitis	Icterus	5 × 32	BLD
3	Intracranial neoplasia	Ataxia, paraparesis	5 × 32	BLD
4	Intestinal lymphoma, meningoencephalitis	Seizures	5 × 32	Negative
5	Hypertensive intracranial bleeding	Neurological deficits	5 × 32	Negative
6	Squamous cell carcinoma	Seizures	5 × 32	Negative
7	Heart failure, chronic interstitial nephritis	Seizures	5 × 32	Negative
8	Renal lymphoma, hippocampal sclerosis	Seizures	5 × 32	Negative
9	Pulmonary adenocarcinoma	Thoracic effusion	5 × 32	Negative
10	Bronchial carcinoma	Thoracic effusion	5 × 32	Negative
11	Pancreatitis, hepatic lipidosis, enteritis	Icterus, ascites	5 × 32	Negative
12	Toxoplasmosis, hypertensive encephalopathy, chronic nephritis	Thoracic effusion	5 × 32	Negative
13	Salmonellosis	Icterus	5 × 32	BLD
14	Chronic glomerulonephritis, conjunctivitis	Glomerulonephritis	5 × 32	Negative
15	Enteritis, cholangiohepatitis	Ascites, icterus	5 × 32	Negative
16	Persisting foramen ovale	Ascites, thoracic effusion	5 × 32	Negative
17	Mediastinal angiosarcoma	Thoracic effusion	5 × 32	Negative
18	Lymphoma (liver, pancreas)	Ascites	5 × 32	Negative
19	T-cell lymphoma	Thoracic effusion	5 × 32	Negative
20	Carcinoma	Thoracic effusion	5 × 32	Negative
21	Lymphoplasmacellular cholangiohepatitis	Icterus, fever	5 × 32	Negative
22	Cholangitis, degenerative poliomyelopathy	Seizures, icterus	5 × 32	Negative
23	Pulmonary adenocarcinoma	Thoracic effusion	5 × 32	Negative
24	Laryngitis, otitis media	Dyspnoea, uveitis	5 × 32	Negative
25	Acute renal failure	Dyspnoea, thoracic effusion	5 × 32	Negative
26	Chronic nephritis	Renal failures, ascites	5 × 32	Negative
27	Meningoencephalitis	Seizures, opisthotonus	5 × 32	Negative
28	Pulmonary carcinoma	Anorexia, dyspnea	5 × 32	Negative
29	Chronic nephropathy	Anorexia, fever	5 × 32	Negative
30	Osteosarcoma, biliary cirrhosis	Ascites	5 × 32	Negative

BLD = feline coronavirus present but below limit of detection

MS Excel, as well as an online program that calculates a non-asymptotic binomial CI (<https://stattools.crab.org/Calculators/binomialConfidence.htm>), were used for statistical analysis.

Results

In 32/34 samples of paraffin-embedded tissue of cats with FIP, FCoV RNA was detected, and in 24 of these, the

FIPV genotype could be determined. Twenty-three samples showed the amino acid substitution M1058L (Table 5). One sample contained a mixed genotype (mixed population of FCoV and FIPV). In seven of the FCoV-positive samples from cats with FIP, genotyping was not possible because of a low virus load (BLD). One sample revealed a high FCoV load (in a cat with FIP), but genotyping was not possible (IND), owing to the occurrence of an

Table 3 Details of the tissues used for genotype-discriminating RT-qPCR for 34 cats with feline infectious peritonitis

Cat	Result of genotype-discriminating RT-qPCR	Tissues sampled
1	BLD	Intestine, kidney, liver
2	BLD	Kidney, liver, spleen
3	FIPV, M1058L	Kidney, lung, muscle, spleen
4	FIPV, M1058L	Kidney, liver, lung, spleen
5	FIPV, M1058L	Intestine, kidney, liver
6	BLD	Intestine, liver, lung, lymph node, spleen
7	FIPV, M1058L	Kidney
8	FIPV, M1058L	Intestine, liver, lung, muscle, pancreas
9	BLD	Kidney, liver, lung
10	FIPV, M1058L	Intestine, liver, lung, spleen
11	FIPV, M1058L	Intestine, liver, lung, spleen
12	FIPV, M1058L	Intestine, kidney, liver, lung, muscle, spleen
13	FIPV, M1058L	Kidney, liver, pancreas, spleen, testis
14	FIPV, M1058L	Intestine, liver, lung, spleen, thyroid
15	FIPV, M1058L	Kidney, spleen
16	BLD	Intestine, kidney, liver, lymph node, spleen
17	FIPV, M1058L	Kidney, spleen
18	FIPV, M1058L	Intestine, liver, lung, spleen
19	Negative	Kidney, liver, lung, lymph node, muscle, spleen, pancreas
20	Negative	Intestine, kidney, lung, lymph node, pancreas, spleen
21	FIPV, M1058L	Heart muscle, intestine, liver
22	FIPV, M1058L	Kidney, liver
23	FIPV, M1058L	Kidney, spleen
24	FIPV, M1058L	Adrenal gland, kidney, liver, lung, spleen
25	IND	Intestine, kidney, lung, muscle, spleen
26	FIPV, M1058L	Adrenal gland, intestine, lymph node, spleen, thyroid, uterus
27	FIPV, M1058L	Intestine, kidney, liver, lymph node, spleen
28	FIPV, M1058L	Kidney, liver, lung, muscle, spleen, thyroid
29	BLD	Kidney, lung, muscle, spleen
30	Mixed genotype	Intestine, kidney, liver, lymph node, spleen
31	FIPV, M1058L	Intestine, kidney, liver, lung, spleen
32	BLD	Intestine, kidney, liver, lung, lymph node, pancreas, spleen
33	FIPV, M1058L	Intestine, kidney, liver, lung, pancreas, spleen
34	FIPV, M1058L	Intestine, kidney, liver, lung, pancreas, spleen

BLD = feline coronavirus (FCoV) present but below limit of detection; FIPV = feline infectious peritonitis virus; IND = FCoV present but indeterminate strain variations

unknown FCoV strain (failed amplification) or infection with a serotype 2 FCoV strain. These eight samples were classified as negative in statistical analysis. Two samples from cats with FIP yielded negative results.

In the control group, 27/30 samples were negative for FCoV RNA. The samples of three control cats yielded positive results in RT-qPCR for FCoV (Tables 5 and 6). However, virus load was too low to allow genotyping (BLD). Sensitivity, specificity, NPV, PPV and overall accuracy of discriminating RT-qPCR to differentiate between cats with FIP and controls are listed in Table 6.

Discussion

The aim of this study was to demonstrate the presence of non-mutated or mutated FCoV in paraffin-embedded

tissues using RT-qPCR, addressing the question of whether the M1058L and S1060A substitutions in the spike protein are responsible for the switch to the FIP disease phenotype or indicate systemic spread of FCoV. Previous studies have looked into the use of PCR in the detection of FCoV in various sample materials of cats with FIP, reporting conflicting results.^{13,15-20} So far, no other study has investigated paraffin-embedded tissues using the recently commercially available genotype-discriminating RT-qPCR.

FIP is always fatal once diagnosis is confirmed. Thus, specificity of a diagnostic test plays a more important role than sensitivity, as cats falsely diagnosed with FIP might be unnecessarily euthanased. In the present study, specificity of the discriminating RT-qPCR in

Table 4 Details of the tissues used for genotype-discriminating RT-qPCR for 30 control cats

Cat	Result of genotype-discriminating RT-qPCR	Tissues sampled
1	Negative	Intestine, kidney, lung, lymph node, muscle, spleen
2	BLD	Intestine, kidney, liver, lung, lymph node, muscle, spleen
3	BLD	Adrenal gland, intestine, kidney, lung, muscle, spleen, thyroid
4	Negative	Adrenal gland, heart muscle, intestine, kidney, liver, lung, spleen
5	Negative	Intestine, liver, muscle
6	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, lymph node, spleen
7	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, muscle, pancreas
8	Negative	Intestine, kidney, liver, muscle, pancreas
9	Negative	Intestine, kidney, liver, muscle
10	Negative	Kidney, liver, lung
11	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, thyroid
12	Negative	Liver, lung, spleen, thyroid, parathyroid
13	BLD	Intestine, lung, pancreas, spleen
14	Negative	Intestine, liver, lung, spleen
15	Negative	Kidney, liver, lung, muscle, pancreas, spleen
16	Negative	Heart muscle, intestine, kidney, liver, lung, spleen
17	Negative	Heart muscle, liver, lung
18	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, muscle, spleen, thyroid
19	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, spleen
20	Negative	Adrenal gland, intestine, kidney, liver, lung, thyroid
21	Negative	Adrenal gland, intestine, kidney, liver, lymph node, spleen
22	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, muscle, pancreas, spleen, stomach, thyroid
23	Negative	Kidney, lung, lymph node
24	Negative	Intestine, liver, pancreas, spleen, thyroid
25	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, spleen, thyroid
26	Negative	Heart muscle, intestine, kidney, lung
27	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, spleen
28	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, spleen
29	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, pancreas, spleen
30	Negative	Intestine, kidney, liver, lung, spleen

BLD = feline coronavirus present but below limit of detection

paraffin-embedded tissues and thus of detecting one of the two spike gene mutations was 100% (95% CI 88.4–100.0). Low FCoV RNA load was detected in tissues of 3/30 cats from the control group. One of the three cats had a parafalcxial meningioma, one was diagnosed with a lymphocytic meningoencephalitis and one had salmonellosis.

As virus load was too low to allow differentiation, either mutated or non-mutated virus could have been present in these three cats. An infection with non-mutated FCoV could occur due to the ability of non-virulent FCoV to spread systemically, as it was shown that FCoV can persist in the organs of healthy cats for up to 80 days post-infection.¹⁹

The presence of mutated virus and therefore an early stage of FIP cannot, however, be excluded. This might have been the case in the cat with lymphocytic meningoencephalitis, as FIP can affect the central nervous system (CNS) and lead to, among other things, meningitis,

with lymphocytes and macrophages predominating.^{20,21} However, necropsy, histopathology and IHC of tissues (including the brains) of both cats with CNS involvement were negative and it therefore seems very unlikely that this was an early stage FIP. It cannot be completely ruled out, though, as there is also the possibility of false-negative staining in IHC due to the occurrence of uneven viral distribution in the tissue samples. Negative IHC staining in a cat in which all other clinical and histopathological findings are suggestive of FIP would not entirely exclude the possibility of FIP. Also, the possibility of mutated virus being present in cats without FIP cannot be completely ruled out, as the presence of the M1058L amino acid substitution has been considered responsible rather for systemic spread of FCoV than for causing FIP.⁶

Contrary to the UK study, in which control cats also showed the M1058L substitution in the spike protein,⁶ this could not be confirmed in the present study. As

Table 5 Results of genotype-discriminating RT-qPCR in paraffin-embedded tissue samples of 64 cats

Group	FIPV* M1058L	FIPV* S1060A	FECV [†]	Mixed genotype*	BLD [†]	IND [†]	Negative [†]	Total
FIP	23	0	0	1	7	1	2	34
Controls	0	0	0	0	3	0	27	30
Total	23	0	0	1	10	1	29	64

*Defined as positive for statistical analysis

[†]Defined as negative for statistical analysis

FIPV = feline infectious peritonitis virus; FECV = feline enteric coronavirus; BLD = feline coronavirus (FCoV) present, but below limit of detection; IND = FCoV present, but indeterminate strain variations; FIP = feline infectious peritonitis

Table 6 Sensitivity, specificity, negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV) and overall accuracy of genotype-discriminating RT-qPCR in 64 cats, including the 95% confidence interval (CI) and prevalence of feline infectious peritonitis (FIP)

	Genotype-discriminating RT-qPCR (n = 64)	95% CI
Sensitivity (%)	70.6	52.5–84.9
Specificity (%)	100.0	88.4–100.0
NPV (%)	75.0	58.8–87.3
PPV (%)	100.0	85.8–100.0
Overall accuracy (%)	84.4	73.1–92.2
Prevalence of FIP (%)	53.1	

samples in the former study were collected post mortem, control cats in that study could have been lacking clinical signs but already harbouring mutated FCoV. This is not very likely, as histopathology, as well as IHC, for mutated virus were negative, but cannot be completely ruled out. FCoV with the respective mutations was not detected in any of the 30 control cats in the present study, thereby supporting the hypothesis that these substitutions truly determine the development of FIP.

Sensitivity of the detection of FIPV in paraffin-embedded tissues was 70.6% (95% CI 52.5–84.9%). In the few existing studies in which PCR was performed on organ tissues, sensitivity was similar and ranged from 87.5–87.9%.^{18,22} However, in one of these studies, the diagnosis of FIP was only based on history, clinical signs and/or pathological changes that were suggestive of FIP, but not all cats underwent histological examinations and in none of the cases was IHC performed to confirm FIP. Furthermore, the PCR used in these studies was not able to definitely distinguish non-mutated FECV from mutated FIPV, which leaves the possibility of animals systemically infected with benign FCoV being falsely detected as positive. In the present study, sensitivity calculated for the presence of 'any FCoV' was 94.1% (95% CI 80.3–99.3) and therefore higher than in previous studies.

Of the 34 cats with FIP, 24 had positive results in the discriminating RT-qPCR. Of these, 23 cats showed the substitution M1058L in the spike protein. One sample revealed a mixed population of FECV and FIPV,

indicating a possible transition state with mutated virus already being present. Also, a superinfection with FECV, which has been described previously,²³ cannot be ruled out. The predominance of the substitution M1058L in the spike protein is very similar to the original study conducted in the Netherlands, in which the amino acid substitution M1058L was present in a majority of tissue samples in cats with FIP.⁵

One sample of a cat with FIP showed an indeterminate result. In this case, genotyping was not possible, despite a high FCoV load in the tissue sample. This might be owing to the occurrence of an unknown FCoV strain (failed amplification) or infection with a serotype 2 FCoV strain, as the two mutations are serotype I-specific. Studies conducted in Austria and Japan revealed that 7% and 30% of cats with FIP were infected with serotype 2 FCoV, respectively.^{24,25}

Two cats with FIP were completely negative for FCoV in the discriminating RT-qPCR, although IHC was positive. This indicates inhomogeneous distribution of virus within the tissue and makes the irregular occurrence of virus in the samples a major limitation of this study. Seven samples of cats with FIP showed the presence of FCoV RNA, although in such a low concentration that genotyping could not be performed. The low amount of virus could be caused by tissues being over-fixed in formaldehyde, making it extremely difficult to extract long, intact fragments of nucleic acid. As samples used in this study were fixed for less than 72 h and subsequently

embedded in paraffin, over-fixation is extremely unlikely. Uneven distribution of virus, as discussed above, could also lead to a low amount of virus being detected. Also, specific antibodies were formerly detected in lesions of cats with FIP¹⁰ possibly binding antigen and therefore reducing the possibility of virus being detected by RT-qPCR. Last, but not least, false-positive staining in the IHC assay cannot be fully excluded in these cats. This possibility cannot be completely ruled out, as no negative controls were included in the IHC protocol, which is a limitation of the study. However, false-positive staining is very unlikely, as both of the negative cats showed typical clinical signs of FIP with effusion, as well as corresponding histopathological changes.

In none of the samples in this study was the substitution S1060A detected. In only one of the samples was FECV detected, and this was in a cat with mixed infection. This makes an assessment of the value of the RT-qPCR regarding the discrimination between the different genotypes of FCoV difficult and a major limitation of this study. It would have strengthened the study if FECV had been detected in more control cats. Further studies should be performed in which a second control group should be included. Furthermore, it was not possible to extract the RNA separately from each tissue and no quantification of virus in tissue samples was performed, although it would have been very interesting to compare different tissues within each cat and to compare the results between the cats. A follow-up study using samples collected prospectively and comparing different tissues including quantification of copy numbers should be performed in the future. No negative controls were included in the IHC protocol, which is another limitation of the study that could potentially have led to an underestimation of the sensitivity of the RT-qPCR.

Conclusions

This study aimed to provide clarity concerning the question of whether or not the M1058L or S1060A substitutions in the spike protein are responsible for the genotype switch reported to cause FIP. In this study, detection of the substitution M1058L correlated 100% with the presence of confirmed FIP, whereas the S1060A substitution was not found in this cohort. It can therefore be concluded that the M1058L substitution in the spike protein appears strongly associated with the genotype switch from FECV to FIPV.

Other, as-yet-unknown strain variations also seem to play a role in the development of FIP, demonstrating the complexity of this fatal disease.

Acknowledgements The authors would like to thank Karin Stingl, Institute of Veterinary Pathology, for her valuable technical assistance in performing the immunohistochemistry.

Supplementary material Cp values retrieved from the endogenous quality control (18S rRNA gene) as well as Cp values for the detection of FCoV RNA (7b gene).

Conflict of interest Christian Leutenegger is the Director of Molecular Diagnostics at IDEXX Laboratories. Hans-Jörg Balzer and Nikola Pantchev are employed at IDEXX Laboratories, Ludwigsburg. This laboratory offers the FCoV and FIPV RT-qPCR on a commercial basis and performed the testing in this study. IDEXX played no role in the study design, in the collection and interpretation of data, or in the decision to submit the manuscript for publication.

Funding The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- 1 Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, et al. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 594–604.
- 2 Borschenky CM and Reinacher M. Mutations in the 3c and 7b genes of feline coronavirus in spontaneously affected FIP cats. *Res Vet Sci* 2014; 97: 333–340.
- 3 Licitra BN, Millet JK, Regan AD, et al. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1066–1073.
- 4 Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 225–258.
- 5 Hui-Wen C, Egberink HF, Halpin R, et al. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1089–1095.
- 6 Porter EI, Tasker S, Day MJ, et al. Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. *Vet Res* 2014; 45: 49.
- 7 Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: virology and immunopathogenesis. *Vet J* 2014; 201: 123–132.
- 8 Vennema H, Poland A, Foley J, et al. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 1998; 243: 150–157.
- 9 Takano T, Azuma N, Satoh M, et al. Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. *Arch Virol* 2009; 154: 775–781.
- 10 Kipar A, Bellmann S, Kremendahl J, et al. Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 65: 243–257.
- 11 Tammer R, Evensen O, Lutz H, et al. Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 49: 177–182.
- 12 Felten S, Matiassek K, Gruendl S, et al. Investigation into the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions for diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 410–418.
- 13 Felten S, Weider K, Doenges S, et al. Detection of feline coronavirus spike gene mutations as a tool to diagnose

- feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 321–335.
- 14 Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, et al. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods* 1999; 77: 37–46.
 - 15 Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, et al. Comparison of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction of peripheral blood mononuclear cells, serum and cell-free body cavity effusion for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 344–350.
 - 16 Pedersen NC, Eckstrand C, Liu H, et al. Levels of feline infectious peritonitis virus in blood, effusions, and various tissues and the role of lymphopenia in disease outcome following experimental infection. *Vet Microbiol* 2015; 175: 157–166.
 - 17 Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, et al. Detection of feline coronavirus in cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats with and without neurological signs. *J Feline Med Surg* 2016; 18: 104–109.
 - 18 Hornyak A, Balint A, Farsang A, et al. Detection of sub-genomic mRNA of feline coronavirus by real-time polymerase chain reaction based on primer-probe energy transfer (P-g-QPCR). *J Virol Methods* 2012; 181: 155–163.
 - 19 Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, et al. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J Gen Virol* 2010; 91: 1698–1707.
 - 20 Foley JE, Lapointe JM, Koblik P, et al. Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 415–423.
 - 21 Künzel F, Rebel-Bauder B, Kasal C, et al. Meningoencephalitis in cats in Austria: a study of infectious causes, including *Encephalitozoon cuniculi*. *J Feline Med Surg* 2015; 19: 171–176.
 - 22 Li X and Scott FW. Detection of feline coronaviruses in cell cultures and in fresh and fixed feline tissues using polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1994; 42: 65–77.
 - 23 Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, et al. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol* 2010; 91: 415–420.
 - 24 Benetka V, Kubber-Heiss A, Kolodziejek J, et al. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2004; 99: 31–42.
 - 25 Hohdatsu T, Okada S, Ishizuka Y, et al. The prevalence of types I and II feline coronavirus infections in cats. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 557–562.

IV. PUBLIKATION II

Detection of feline coronavirus RNA, spike gene mutations, and feline coronavirus antigen in macrophages in aqueous humor of cats in the diagnosis of feline infectious peritonitis

Laura Sangl¹

Sandra Felten¹, Dr. med. vet.

Kaspar Matiasek², Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Associate Member ECVN

Stefanie Doerfelt¹, Dr. med. vet.

Michele Bergmann¹, Dr. med. vet.

Hans-Joerg Balzer³, Dr. rer. nat.

Nikola Pantchev³, Dr. med. vet.

Christian M. Leutenegger⁴, Dr. med. vet., Ph.D.

Katrin Hartmann¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine)

¹Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

²Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

³IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany

⁴IDEXX Laboratories, Inc., West Sacramento, USA

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, veröffentlicht

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, First Published June 9, 2020

doi: 10.1177/1040638720927362. Online ahead of print



Full Scientific Report



Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
1-5
© 2020 The Author(s)
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journalsPermissions
DOI: 10.1177/1098616720927361
jvdi.sagepub.com

Detection of feline coronavirus RNA, spike gene mutations, and feline coronavirus antigen in macrophages in aqueous humor of cats in the diagnosis of feline infectious peritonitis

Laura Sangl,¹ Sandra Beltan, Karper Matiaszek, Stefanie Dörflert, Michalis Bergmann, Hans-Jörg Bausor, Nikols Panchchev, Christian Leutenegger, Katrin Hartmann

Abstract. Uveitis is common in cats, and is often a feature of feline infectious peritonitis (FIP). We evaluated 3 tools for detection of feline coronavirus (FCoV) in aqueous humor: 1) a 7b gene reverse-transcription real-time PCR (7b-RT-rPCR) assay to detect FCoV RNA, 2) a spike gene mutation RT-rPCR (S-RT-rPCR) assay to detect 2 point mutations in the spike gene of FCoV in cats positive by 7b-RT-rPCR, and 3) immunocytochemistry (ICC) for detection of FCoV antigen in aqueous humor macrophages. We studied 58 cats, including 31 cats with FIP and 27 control cats. FIP was excluded by postmortem examination and negative immunohistochemistry (IHC). Aqueous humor samples obtained postmortem were assessed using 7b-RT-rPCR in all cats, and positive samples were evaluated with S-RT-rPCR. ICC evaluation of aqueous humor samples from 36 of the 58 cats was done using an avidin-biotin complex method and monoclonal anti-FCoV IgG 2A. Sensitivity, specificity, and negative and positive predictive values were calculated including 95% CIs. 7b-RT-rPCR had a specificity of 100.0% (95% CI: 87.2–100.0) and sensitivity of 95.5% (95% CI: 19.3–94.6). Specificity of S-RT-rPCR could not be determined because there were no FCoV 7b-RT-rPCR-positive samples in the control group. Sensitivity of S-RT-rPCR was 12.9% (95% CI: 3.6–29.8). Sensitivity and specificity of ICC were 62.5% (95% CI: 40.6–81.2) and 80.0% (95% CI: 44.4–97.5), respectively. The combination of 7b-RT-rPCR and IHC could be useful in diagnosing FIP; S-RT-rPCR did not add value, and ICC of aqueous humor samples cannot be recommended for the diagnosis of FIP.

Key words: 7b gene reverse-transcription real-time PCR; aqueous humor; cats; feline infectious peritonitis; immunocytochemistry; spike gene mutation reverse-transcription real-time PCR; uveitis.

Introduction

Feline infectious peritonitis (FIP) affects cats worldwide and is a fatal disease if left untreated. Although feline coronavirus (FCoV; *Alphacoronavirus 1*) is ubiquitous, it rarely causes disease. It is thought that mutation of the virus in infected cats leads to the development of FIP.^{1,2} A study conducted in 2012 detected 2 nucleotide mutations in positions 23531 and 23537 of the FCoV spike (S) gene, leading to amino acid substitutions (methionine to leucine at position 1058; asinine to alanine at position 1060) in the spike protein that correlated with FIP in >95% of cases.³ However, the amino acid substitution M1058L has also been detected in tissue of cats with systemic FCoV infection but no signs of FIP.^{3,4} Therefore, it is still a matter of discussion whether these mutations are responsible for the development of FIP or are instead an indicator of systemic spread of FCoV.⁵ Other mutations that might play a role in the pathogenesis of

FIP have been discussed, such as substitutions in the furin cleavage site between receptor-binding (R1) and fusion (R2) domains of the spike protein, supporting systemic spread of FCoV.⁶

Diagnosing FIP antemortem is challenging, especially in cats without effusion.¹ A definitive diagnosis can only be

Clinic of Small Animal Medicine (Sangl, Hartmann, Dörflert, Beltan, Bergmann) and Section of Clinical and Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology (Matiaszek), Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Bayern, Germany; Eiken Laboratories, Ludwigshafen, Germany (Bausor, Panchchev) and West Sacramento, CA (Leutenegger).

¹Corresponding author: Laura Sangl, Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinärstrasse 15, Munich, Bayern, 80539, Germany. laura.sangl@gmz.de

achieved by immunohistochemistry (IHC) for detection of PCoV antigen within lesions.^{2,22} However, false-negative IHC results can occur because of non-uniform distribution of lesions within tissues and non-uniform distribution of virus within lesions.²²

Therefore, a reliable test is needed for the diagnosis of FIP. Detection of PCoV RNA using reverse transcription PCR (RT-PCR) in effusions of cats with FIP and controls revealed a specificity of 100%, making a positive result highly indicative of FIP.¹⁵ In cats without effusion, whole blood, serum, or plasma samples are commonly tested for viral RNA, but the results are inconsistent.^{4,9,17,23} In addition, healthy cats can have positive results in RT-PCR of blood samples.^{4,15} Thus, blood is not considered a good substrate for diagnosing FIP in cats.

RT-PCR of aqueous humor has not been used routinely for the diagnosis of FIP, even though ocular involvement, manifesting mainly as uveitis and chorioretinitis,^{11,24} occurs in ~28% of cats with confirmed FIP.²⁵ If aqueous humor is collected during a diagnostic work-up, detection of PCoV could be added. The aim of our study was to determine whether testing samples of aqueous humor for PCoV could be used in the diagnosis of FIP. The tests included 1) a 7b gene reverse-transcription real-time PCR (7b-RT-rPCR) to detect PCoV RNA in aqueous humor, 2) a *S* gene mutation RT-rPCR (S-RT-rPCR) to detect mutated PCoV, and 3) immunocytochemistry (ICC) to detect PCoV antigen in aqueous humor macrophages.

Materials and methods

Cats

We enrolled 58 cats in our study, including 31 cats with FIP and 27 control cats with other diseases. Twenty-five of the 31 cats with FIP and 11 of the 27 control cats were part of a previous study.²⁶ All cats had naturally acquired diseases and were client owned. Our study was approved by the ethics committee of the Centre for Clinical Veterinary Medicine of the Ludwig-Maximilians-Universität Munich (reference S2-27-07-2015).

Of the 58 cats, 5 had uveitis based on postmortem examination (4 in the FIP group, 1 in the control group); in the other cats, no ocular changes were noticed at clinical or post-mortem examination. A diagnosis of FIP was based on the results of postmortem and histologic examinations as well as IHC of various organs including ocular tissue in all cats with uveitis.¹¹ Only cats with macroscopic and histologic lesions typical of FIP and positive IHC staining of affected tissue samples were included in the FIP group (Table 1).

In all control cats, a postmortem examination, which included macroscopic and histologic examinations, was carried out to exclude FIP as the cause of death. Immunohistochemical staining of tissue samples showing histopathologic

changes was negative for PCoV in all cats (Table 2). The individuals performing the laboratory tests were unaware of the underlying diagnoses.

Samples

Samples of aqueous humor were obtained postmortem via anterior chamber paracentesis using a 22-ga needle and a 2-mL syringe. All eyes were sampled by inserting the needle at the temporal limbus and positioning it parallel to the iris before advancing it into the anterior chamber for aspiration of aqueous humor. For 7b-RT-rPCR and S-RT-rPCR, samples of aqueous humor from both eyes of each cat were mixed and stored immediately after collection in cryogenic vials at -80°C. To determine the presence of PCoV RNA and to detect possible *S* gene mutations, 3 rPCR assays were done (Idexx Laboratories). For ICC, 100 µL of aqueous humor was cytocentrifuged (Cytospin centrifuge Universal R; Becton), and slides were stored at -20°C until analyzed. One slide was prepared for each cat.

7b-RT-rPCR

Total nucleic acid was extracted from aqueous humor samples (QIAamp DNA blood BioRobot MDx kit; Qiagen) according to the manufacturer's instructions with slight modifications (Idexx Laboratories). RT-rPCR to detect PCoV was performed based on the occurrence of the 7b gene.¹⁵

The 7b-RT-rPCR was run with 5 quality controls that included: 1) PCR-positive controls (quantitatively, using synthetic DNA covering the RT-PCR target region [Integrated DNA Technologies]); 2) PCR-negative controls (PCR-grade, nuclease-free water); 3) negative extraction controls (extraction positions filled with nucleic acid-free water only); 4) a swab-based environmental contamination monitoring control; and 5) split-in internal positive control (using lambda phage DNA). These controls assessed the functionality of the RT-PCR test protocols (control 1), for the absence of contamination in the reagents (2) and laboratory (4), absence of cross-contamination during the extraction process (3), and absence of RT-PCR inhibitory substances as a carryover from the sample matrix (5). The analytical as well as the clinical specificity of the 7b-RT-rPCR was confirmed by resequencing amplification products with dedicated sequencing primers located 5' and 3' to those used in the routine RT-PCR protocol.

S-RT-rPCR

All samples positive by 7b-RT-rPCR were evaluated by the S-RT-rPCR to discriminate between non-mutated and mutated virus, with 2 RT-rPCRs carried out targeting the M1058L and S1060A single-nucleotide variations (SNVs) within the fusion peptide of the spike protein (Idexx Labora-

PCoV RNA, spike protein mutations, and PCoV antigen in aqueous humor to diagnose FIP

3

Table 1. Presence of urethra and body cavity effusion and the results of 75-RT-qPCR for detection of PCoV, results of *S*-RT-qPCR, and results of EOC in aqueous humor of 31 cats with FIP. In all cats, FIP was confirmed by histologic evaluation and positive IHC results.

Cat	Urethra	Body cavity effusion	75-RT-qPCR	<i>S</i> -RT-qPCR	EOC
1	No	Absent	—	ND	—
2	No	Absent	—	ND	—
3	No	Absent	+	BLD	+
4	Yes	Absent	+	BLD	—
5	Yes	None	—	ND	+
6	No	Absent	—	ND	+
7	No	Floral effusion	+	BLD	+
8	No	Absent, pleural effusion	+	BLD	—
9	No	Absent	—	ND	—
10	No	Absent	—	ND	+
11	No	Absent	—	ND	+
12	No	Absent	+	BLD	+
13	Yes	Absent	+	BLD	—
14	No	Absent	—	ND	—
15	No	Absent	+	Mutated PCoV	+
16	No	Absent	—	ND	+
17	No	None	+	Mutated PCoV	+
18	No	None	—	ND	—
19	No	Absent	—	ND	+
20	No	Absent	+	BLD	+
21	No	Absent	—	ND	+
22	Yes	None	—	ND	+
23	No	Absent	—	ND	—
24	No	Absent	—	ND	+
25	No	Floral effusion	+	Mutated PCoV	Non-diagnostic
26	No	Absent, pericardial effusion	—	ND	NA
27	No	Floral effusion	—	ND	NA
28	No	Absent, pericardial effusion	—	ND	NA
29	No	Absent	+	Mixed viral RNA	NA
30	No	Absent	—	ND	NA
31	No	Absent	—	ND	NA

BLD = PCoV RNA was detected, but because viral load was low, differentiation of non-mutated and mutated PCoV using *S*-RT-qPCR was not possible; PCoV = false seronegativity; FIP = false infectious peritonitis; EOC = immunohistochemistry to detect PCoV antigen; IHC = immunohistochemistry to detect PCoV antigen; mixed viral RNA = detection of PCoV RNA with the mutation at position 3174 or 3180 as well as RNA of non-mutated PCoV; NA = insufficient sample material available; ND = not detected; *S*-RT-qPCR = spike gene mutation reverse-transcription real-time PCR; 75-RT-qPCR = 75 gene RT-qPCR.

torine, unpublished data). The *S*-RT-qPCRs allow the typing of an PCoV strain based on the presence (mutated PCoV) or absence (non-mutated) of 1 of 2 SNVs within the fusion peptide of the *S* gene. The paired *S*-RT-qPCRs were previously validated analytically using synthetic DNA positive controls (IDT DNA Technologies) as well as clinically using samples collected from cats originally used to identify the 2 *S* gene mutations: cats 1) infected with PCoV and shedding but otherwise healthy, and 2) affected by FIP.¹³ Briefly, highly specific hydrolysis probes were used to detect mutated and non-mutated sequences. The mutation detected at position 3174 (A→C/T) or 3180 (T→G) on the PCoV genome corresponded to amino acid positions 1038 and 1066; nucleotide 23531 and 23537; and M1058L and S1060A of reference sequence F934051, respectively. The non-mutated sequences were identified using an allelic discrimination approach

(Idexx Laboratories, unpublished data). Probes for mutated and non-mutated *S* gene sequences were fluorophore-labeled (6-FAM and VIC, respectively). Results were analyzed to determine the 6-FAM:VIC (FIPV:FCV) fluorescence ratio emitted by the hydrolysis probes. *S*-RT-qPCR was considered positive for either mutation when fluorescence in the mutation probe was at least 2-fold higher than in the non-mutated probe. *S*-RT-qPCR was considered negative when 1) no PCoV was detected (negative), 2) PCoV without 1 of the 2 *S* gene mutations was detected (non-mutated), 3) PCoV load was below the cutoff of 1.5 million RNA equivalents per mL, which did not allow successful differentiation of the PCoV strains via *S*-RT-qPCR (below limit of determination, BLD), or 4) no further differentiation via *S*-RT-qPCR was possible despite a high PCoV load (>1.5 million RNA equivalents per mL of sample; indeterminate, IND). *S*-RT-qPCR was consid-

4

Sangl et al.

Table 2. Diagnosis, presence of uveitis, results of 7S-RT-qPCR for detection of FCvV, results of *S*-RT-qPCR, and results of ICC in aqueous humor of 27 control cats. In all cats, FIP was excluded by histopathology and negative IHC results.

Cat	Diagnosis	Uveitis	7S-RT-qPCR	<i>S</i> -RT-qPCR	ICC
1	Bacteritis, cholangiohepatitis	No	—	ND	—
2	Globoid cell leukodystrophy	No	—	ND	—
3	Intraocular neoplasia	No	—	ND	—
4	Pulmonary adenocarcinoma	No	—	ND	+
5	Meningoencephalitis	No	—	ND	—
6	Lymphoma	No	—	ND	—
7	Lymphoma	No	—	ND	+
8	Cholangiohepatitis	No	—	ND	—
9	Sarcomatosis	No	—	ND	—
10	Cholangitis, degenerative polyneuritis	No	—	ND	—
11	Pulmonary adenocarcinoma	No	—	ND	Non-diagnostic
12	Ventricular septal defect, aortic atherosclerosis	No	—	ND	NA
13	Pulmonary adenocarcinoma	No	—	ND	NA
14	Chronic kidney disease	No	—	ND	NA
15	Lymphoma	No	—	ND	NA
16	Otitis media, laryngeal inflammation	Yes	—	ND	NA
17	Chronic kidney disease, lung edema	No	—	ND	NA
18	Lymphoma	No	—	ND	NA
19	Pulmonary carcinoma, bile duct carcinoma	No	—	ND	NA
20	Pulmonary adenocarcinoma	No	—	ND	NA
21	Intestinal lymphoma, mesothelioma	No	—	ND	NA
22	Multifocal lymphoma	No	—	ND	NA
23	Metastatic adenocarcinoma	No	—	ND	NA
24	Chronic kidney disease	No	—	ND	NA
25	Pulmonary neoplasia	No	—	ND	NA
26	Autoimmune encephalitis	No	—	ND	NA
27	Osteosarcoma	No	—	ND	NA

See Table 1 notes for definitions of abbreviations.

Table 3. Results of ICC, 7S-RT-qPCR, and *S*-RT-qPCR in aqueous humor samples.

Group	Total	ICC		7S-RT-qPCR negative ^a	7S-RT-qPCR positive	Amino acid substitution		Non- mutated ^b	Mixed viral RNA [†]	ILD ⁺	IND ⁺
		positive	negative			M105H [†]	S1060A [†]				
FIP	31	15	9	20	11	5	0	0	1	7	0
Controls	27	2	0	27	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	58	17	9	47	11	5	0	0	1	7	0

ND = FCvV RNA found in high concentration, with the *S*-RT-qPCR not yielding a result because of subversion sequence in the *S* gene not being detected by the primers. See Table 1 notes for definitions of remaining abbreviations.

^a Defined as 7S-RT-qPCR-negative for statistical analysis.

[†] Defined as *S*-RT-qPCR-positive for statistical analysis.

were positive when: 1) FCvV with a mutated *S* gene (either mutation in nucleotide 23531 or 23537), or 2) both mutated and non-mutated *S* genes were detected in the same sample (mixed viral RNA; Table 3).

Immunocytochemistry

ICC was carried out in 25 samples from 31 cats with FIP and in 11 samples from 27 controls, as described previously.¹¹ In the

remaining 22 cats, the yield of material was insufficient to carry out ICC. Stained slides were evaluated for cellularity and positive staining using light microscopy; only samples containing >50 nucleated cells were included in the analysis. Samples were considered positive when macrophages had dark brown granulated cytoplasm, and negative when the cytoplasm of macrophages was not dark brown or there were cells with non-specific immunostaining, which included lymphocytes, neutrophils, erythrocytes, and plasma cells. Samples with a lack of

FCoV RNA, spike protein mutations, and FCoV antigen in aqueous humor to diagnose FIP

5

Table 4. Sensitivity, specificity, NPV, PPV, and overall accuracy of different methods to diagnose FIP and prevalence of FIP. Sensitivity of *S*-RT-rPCR was calculated for all 31 cats with FIP. Two ICC samples were excluded from statistical analysis.

	7b-RT-rPCR (%; n = 58)	<i>S</i> -RT-rPCR (%; n = 31)	ICC (%; n = 34)
Sensitivity	35.5 (19.2–54.6)	12.9 (3.6–28.8)	62.5 (48.6–81.2)
Specificity	100.0 (87.2–100.0)	ND	80.8 (44.4–97.5)
NPV	57.4 (42.3–73.7)	ND	47.1 (23.0–72.2)
PPV	100.0 (71.5–100.0)	ND	88.2 (83.6–98.3)
Overall accuracy	65.5 (51.9–77.3)	ND	67.6 (49.3–82.6)
Prevalence	53.4	36.4	70.6

NPV – negative predictive value; PPV – positive predictive value. See Table 1 notes for definitions of matching abbreviations. Numbers in parentheses are 95% CIs.

Table 5. Results of histologic evaluation, IHC of ocular tissue, 7b-RT-rPCR, *S*-RT-rPCR, and ICC of aqueous humor in cats with uveitis and FIP, as well as control cats with uveitis.

Cat	Histologic findings	IHC of ocular tissue	7b-RT-rPCR	<i>S</i> -RT-rPCR	ICC
Cats with FIP					
4	Lymphoplasmacellular infiltration of the iris with macrophages and plasma cells in the anterior chamber and iridocorneal angle	+	+	BLD	–
3	Pyogranulomatous uveal inflammation, retinal atrophy	+	–	ND	+
13	Mixed, predominantly lymphoplasmocytic iridocyclitis and chorioiditis	+	+	BLD	–
22	Uveitis, lymphoplasmacellular infiltration of the iris	–	–	ND	+
Control cats					
16	Profound chronic lymphoplasmocellular endophthalmitis, keratitis, iridocyclitis, uveitis, and retinitis with edema and retinal staphy, pigmentation of the cornea, and mineralization of the lens	–	–	ND	NA

See Table 1 notes for definitions of abbreviations.

cellular material on the slides were categorized as nondiagnostic and excluded from statistical analysis.

Statistical evaluation

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), overall accuracy, and 95% CIs were determined (Table 4). When evaluating *S*-RT-rPCR results, samples revealing BLD or IND were considered negative; samples containing mixed viral RNA were considered positive. Microsoft Excel and an online program calculating a non-symptotic binomial CI (<https://stattools.ucsb.org/Calculators/binomialConfidence.htm>) were used.

Results

All 27 samples from control cats were negative for FCoV RNA (Tables 2, 3). In cats with FIP, FCoV RNA was detected in 11 of 31 aqueous humor samples using 7b-RT-rPCR. Of the 11 positive samples, 3 had a mutation corresponding to the uridine acid substitution M105IL (Table 3) in *S*-RT-rPCR, and in one sample, mixed viral RNA was detected (Table 1). In the remaining seven 7b-RT-rPCR-positive samples, *S*-RT-rPCR could not be performed because of low

viral load. The specificity of *S*-RT-rPCR could not be determined because none of the samples from control cats were positive by 7b-RT-rPCR.

Thirty-six samples (25 FIP, 11 controls) were available for ICC. In cats with FIP, 15 samples were positive, and in control cats, 2 were positive (Tables 1–3). In 2 control cats, the ICC result was unclear because of dark brown immunostaining in macrophages; these were considered negative given that they lacked the typical granular pattern seen in positive ICC staining. Two samples (1 in a cat with FIP, 1 in a control cat) were excluded from statistical analysis because of the lack of cellular material on the slides.

Four cats with FIP and 1 control cat had ocular signs, which included lymphoplasmacellular endophthalmitis, keratitis, iridocyclitis, uveitis, and retinitis (Table 5). Of the 4 cats with FIP, IHC of ocular tissue was positive in 3 cases and negative in 1; the latter cat was diagnosed with FIP based on positive results of IHC of organ tissue samples.

Discussion

Specificity of 7b-RT-rPCR in aqueous humor was 100% (95% CI: 87.2–100.0). Although promising results have been achieved using the nucleoside analog GS-441524,^{24,28} as

well as the protease inhibitor GC376,²⁸ for treatment of cats with FIP, a commercial drug is not yet available. Therefore, specificity of a test for FIP remains more important than sensitivity because misdiagnosis would likely lead to euthanasia of many cats. The high specificity of 78-RT-rPCR in aqueous humor was unexpected because FCoV is widespread in the cat population and FCoV RNA can be detected in blood and tissue samples of cats that do not have FIP.^{34,35,36}

The absence of FCoV RNA in aqueous humor samples of the control group might be explained because the cats were not infected with FCoV or an intact blood-aqueous barrier prevented spillover of infected macrophages from the blood. The role of the blood-brain barrier (BBB) for FCoV entry into cerebrospinal fluid (CSF) has been discussed.⁷ FCoV RNA was detected in CSF of cats with FIP indicating that macrophage-bound FCoV is able to enter the CSF via an impaired BBB.⁷ Further studies showed positive immunostaining of macrophages in CSF in cats with FIP.^{14,19} However, because only one of the control cats had ocular involvement, absence of FCoV infection and/or an intact blood-aqueous barrier are the most likely reasons for the negative results.

The sensitivity of 78-RT-rPCR in aqueous humor was 35.5% (95% CI: 19.2–54.6). The relatively low sensitivity in cats with FIP might have been because only a small number of cats had signs of uveitis. Previous studies have used PCR to detect other pathogens in samples of aqueous humor. Feline herpesvirus 1 (FHV-1) DNA was detected by PCR in 11 cats with uveitis,³⁷ and *Thelazium axei* DNA was found in 8.7% of healthy cats and 18.6% of cats with uveitis³⁸; hence, viruses and protozoa are more likely to enter the aqueous humor when infection leads to a compromised blood-aqueous barrier. Interestingly, only 2 of 4 cats with FIP and uveitis in our study had positive 78-RT-rPCR results. The results of IHC of ocular tissue were positive in 3 of the 4 cats with FIP.

Even though FCoV RNA was detected in aqueous humor in 11 of 31 cats with FIP, only 4 had 1 of the 2 *S* gene mutations. Thus, sensitivity of *S*-RT-rPCR for the 31 cats with FIP was low (12.9%; 95% CI: 3.6–29.8). Three of the 4 cats had the *S* gene mutation leading to the amino acid substitution M1054L. The fourth sample was positive for non-mutated as well as mutated FCoV, indicating the existence of different FCoV strains within a cat. The samples of the other 7 cats contained FCoV in such low quantities that a differentiation was not possible using our assay.

IHC evaluation of aqueous humor revealed positive staining for FCoV antigen in 2 of 10 cats of the control group, which yielded a specificity of only 80.0% (95% CI: 44.4–97.5) for this technique. Of the 2 false-positive cats, one had pulmonary adenocarcinoma and the other lymphoma, and both had no ocular signs at macroscopic postmortem examination. However, cytologic evaluation of aqueous humor of these 2 control cats revealed a moderate number of inflammatory cells (Table 6). It is plausible that false-positive results were attributable to nonspecific positive staining of

target proteins inside macrophages,³⁴ although the use of normal goat serum to block nonspecific antibody binding during ICC should have minimized this risk. In addition, both samples were positive for melanin, which might have been confused with the 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) used in the ICC staining process. Another possibility is that these 2 cats were in an early subclinical stage of FIP because of immunosuppression associated with their primary illness. However, IHC of tissues with lesions was negative. It has been shown that healthy cats can harbor FCoV in tissue macrophages of various organs.²² Thus, the positive results could have been staining of non-mutated virus, although this is unlikely given that 78-RT-rPCR in these 2 cats was negative.

Sensitivity of ICC of aqueous humor was 62.5% (95% CI: 40.6–81.2) and thus higher than that of 78-RT-rPCR. The higher sensitivity was unexpected because ICC likely needs more viral particles than RT-rPCR for a positive result. It is possible that intracellular FCoV antigen is better conserved, and viral RNA in aqueous humor is more easily destroyed during storage and transport. On the other hand, based on findings in control cats, false-positive ICC staining in cats with FIP might have contributed to spuriously high sensitivity.

Nine cats with FIP had false-negative results in ICC of aqueous humor samples. All 9 of these aqueous humor samples had signs of inflammation on cytologic evaluation, but FCoV antigen was not present, which indicates that perhaps the inflammatory process was not severe enough for the virus to cross the aqueous-blood barrier (Table 6). In dogs experimentally infected with canine infectious hepatitis virus, the absence of virus in aqueous humor coincided with the presence of specific antibodies at the time of ikterohemorrhagic.³⁹ Thus, the false-negative ICC results might have been the result of local antibody production, which would bind and mask the antigen in ICC. Alternatively, antibodies entering aqueous humor via inflamed vessels could bind to existing antigen, leading to a failure of detection of the virus by ICC. To our knowledge, the presence of antibodies against FCoV in aqueous humor has not been assessed.

Our study has a few limitations. Samples were obtained postmortem, which might have led to a reduction in the amount of viral RNA and antigen because of degradation. Histologic evaluation and IHC of ocular tissue were done in only a few cases and not routinely in all cats. Finally, *S*-RT-rPCR was not carried out on the samples of all cats. It is theoretically possible, albeit unlikely, that there was a sequence mutation at PCR primer sites, which would have resulted in samples being negative for 78-RT-rPCR but positive for *S*-RT-rPCR. Such false-negative results in 78-RT-rPCR might have contributed to the low sensitivity of the *S*-RT-rPCR.

Although 78-RT-rPCR was specific in the diagnosis of FIP in our study, it had a low sensitivity of 35.5%, and the use of *S*-RT-rPCR did not lead to an increase in specificity. ICC had the best sensitivity (62.5%), but its specificity was

FCoV RNA, spike protein mutations, and FCoV antigen in aqueous humor to diagnose FIP

7

Table 6. Presence of uveitis and results of 7S-RT-rPCR, ICC, cytology, and presence of protein in aqueous humor samples in 24 cats with FIP and 10 control cats in which ICC was performed (2 samples were excluded because of a leak of material on the slide).

Cat	Uveitis	7S-RT-rPCR	ICC	Cytology with protein content and cellularity of aqueous humor ^a	Cytologic interpretation
Cats with FIP					
1	No	—	—	Neutrophils, protein+, cellularity+	Not indicative of FIP
2	No	—	—	Mixed cells, neutrophils, cellularity+	Compatible with FIP
3	No	+	+	Neutrophils, macrophages, cellularity+	Typical for FIP
4	Yes	+	—	Lymphoplasmacytic, neutrophils, macrophages, protein+, cellularity+++	Not indicative of FIP
5	Yes	—	+	No inflammatory cells, protein+++ , cellularity+	Not indicative of FIP
6	No	—	+	Macrophages, neutrophils, cellularity+	Compatible with FIP
7	No	+	+	Pyogranulomatous, protein+, cellularity++	Typical for FIP
8	No	+	—	Plasma cells, neutrophils, protein+, cellularity++	Not indicative of FIP
9	No	—	—	Lymphomonocytic, pyogranulomatous, protein+, cellularity++	Compatible with FIP
10	No	—	+	Lymphomonocytic, macrophages, protein+, cellularity++	Not indicative of FIP
11	No	—	+	Pyogranulomatous, cellularity++	Typical for FIP
12	No	+	+	Lymphomonocytic, macrophages, protein+, cellularity++	Compatible with FIP
13	Yes	+	—	Pyogranulomatous, cellularity++	Typical for FIP
14	No	—	—	Lymphomonocytic, neutrophils, protein+, cellularity+	Compatible with FIP
15	No	+	+	Pyogranulomatous, protein+++ , cellularity+++	Typical for FIP
16	No	—	+	Lymphomonocytic, macrophages, neutrophils, protein++, cellularity+	Compatible with FIP
17	No	+	+	Lymphomonocytic, neutrophils, protein+, cellularity++	Compatible with FIP
18	No	—	—	Lymphomonocytic, cellularity+	Not indicative of FIP
19	No	—	+	Lymphomonocytic, neutrophils, macrophages, protein++, cellularity++	Compatible with FIP
20	No	+	+	Pyogranulomatous++, protein+, cellularity++	Typical for FIP
21	No	—	+	Lymphomonocytic, macrophages, protein+, cellularity+	Typical for FIP
22	Yes	—	+	Lymphomonocytic, neutrophils, protein+, cellularity++	Compatible with FIP
23	No	—	—	Pyogranulomatous, protein+, cellularity++	Typical for FIP
24	No	—	+	Lymphomonocytic, macrophages, protein+++ , cellularity+++	Not indicative of FIP
Control cats					
1	No	—	—	Neutrophils with necrosis, cellularity++	Not indicative of FIP
2	No	—	—	Lymphomonocytic, cellularity+	Not indicative of FIP
3	No	—	—	Neutrophils, cellularity+	Not indicative of FIP
4	No	—	+	Lymphocytic, macrophages, protein+, cellularity++	Not indicative of FIP
5	No	—	—	Erythrocytes, protein+, cellularity+	Not indicative of FIP
6	No	—	—	Neutrophils, lymphocytic, protein+, cellularity+	Not indicative of FIP
7	No	—	+	Lymphomonocytic, protein+, cellularity++	Not indicative of FIP
8	No	—	—	Lymphomonocytic, protein+, cellularity++	Not indicative of FIP
9	No	—	—	Neutrophils, protein+, cellularity++	Not indicative of FIP
10	No	—	—	Mixed cells, protein+, cellularity++	Compatible with FIP

For Table 1 notes for definition of observations.
 + = mild, ++ = moderate, +++ = marked.

unacceptably low. Only 5 of 58 cats had uveitis and, thus, the sensitivity of the laboratory tests might have been higher if only cats with uveitis had been evaluated. Based on the results of our study, the combination of 7S-RT-rPCR and ICC could be useful in diagnosing FIP; 5S-RT-rPCR did not add value, and ICC of aqueous humor samples cannot be recommended for the diagnosis of FIP.

Acknowledgments

We thank Karin Stügel, Institute of Veterinary Pathology, for her valuable technical assistance in performing the ICC.

Declaration of conflicting interests

C. Leutenegger was the Head of Molecular Diagnostics at Mérieux Laboratories, at the time the study was performed. H.-J. Babatz and N. Pentzner are employed at Mérieux Laboratories, Ludwigshafen; this laboratory offers the FCoV and FIP virus RT-rPCR on a commercial basis and performed the testing in our study. Mérieux played no role in the study design, in the collection and interpretation of data, or in the decision to submit the manuscript for publication. K. Hartmann has collaborated with and given talks for various companies, including Mérieux Laboratories. There is no commercial conflict of interest given that the information presented here is solely for scientific dissemination. The authors declare that they have no competing interests.

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

ORCID ID

Laura Sangli  <https://orcid.org/0008-0062-0475-9271>

References

1. Addie DD, et al. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *J Feline Med Surg* 2004;6:125–130.
2. Addie DD. Update: European Advisory Board on Cat Diseases guidelines on feline infectious peritonitis. 2019 May. [cited 2020 Apr 15]. <http://www.shedcutwaters.org/feline-infectious-peritonitis>
3. Barker IN, et al. Limitations of using feline coronavirus spike protein gene mutations to diagnose feline infectious peritonitis. *Vet Res* 2017;48:66.
4. Can-Selma K, et al. The detection of feline coronavirus in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *J Feline Med Surg* 2007;9:369–372.
5. Carmichael LE. The pathogenesis of ocular lesions of infectious canine hepatitis. I. pathology and virological observations. *Pathol Vet* 1964;1:73–83.
6. Chang HW, et al. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Retrovirology* 2012;10:1049–1055.
7. Deanege SJ, et al. Detection of feline coronavirus in cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats with and without neurological signs. *J Feline Med Surg* 2016;18:184–189.
8. Deanege SJ, et al. Comparison of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction of peripheral blood mononuclear cells, serum and all-time body cavity effusion for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017;19:344–350.
9. Egberink HF, et al. FIP, easy to diagnose? *Vet Q* 1995;17:24–25.
10. Falten S, et al. Utility of an immunocytochemical assay using aqueous humor in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Ophthalmol* 2019;21:23–34.
11. Falten S, et al. Investigation into the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions for diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017;19:410–418.
12. Falten S, et al. Detection of feline coronavirus spike gene mutations as a tool to diagnose feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017;19:321–335.
13. Gelatt KN. Ependymitis-panophthalmitis associated with feline infectious peritonitis. *Vet Med Small Anim Clin* 1973;68:56–67.
14. Grumell S, et al. Diagnostic utility of cerebrospinal fluid immunocytochemistry for diagnosis of feline infectious peritonitis manifesting in the central nervous system. *J Feline Med Surg* 2017;19:376–383.
15. Guzmán-Morán DA, et al. Detection of feline coronavirus by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 1998;62:183–205.
16. Gut M, et al. One-tube Booygenis averus transcription-polymerase chain reaction for the quantification of feline coronavirus. *J Virol Methods* 1999;77:37–46.
17. Hartmann K, et al. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2003;17:781–790.
18. Idexx Laboratories. FIP virus RealPCR test validation studies. 2016. [cited 2020 Apr 15]. www.idexx.com/FIPValidationStudies
19. Ives BJ, et al. Immunocytochemical demonstration of feline infectious peritonitis virus within cerebrospinal fluid macrophages. *J Feline Med Surg* 2013;15:1149–1153.
20. Kiper A, McE ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Vet Pathol* 2014;51:505–536.
21. Kiper A, et al. Effect of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J Gen Virol* 2018;91:1698–1707.
22. Lapple MK, et al. Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor of cats. *Am J Vet Res* 1994;57:1588–1593.
23. Lichten HN, et al. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1064–1073.
24. Linder AL, et al. Diagnostic utility of a direct immunofluorescence test to detect feline coronavirus antigen in macrophages in effusive feline infectious peritonitis. *Vet J* 2013;194:362–366.
25. Mays DN, et al. Detection of feline herpesvirus-specific antibodies and DNA in aqueous humor from cats with or without uveitis. *Am J Vet Res* 1990;50:932–944.
26. Murphy BG, et al. The nucleoside analog GS-441524 strongly inhibits feline infectious peritonitis (FIP) virus in tissue culture and experimental cat infection studies. *Vet Microbiol* 2012;159:224–233.
27. Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: diagnostics and therapeutics. *Vet J* 2014;201:133–141.
28. Pedersen NC, et al. Efficacy of a 3C-like protease inhibitor in treating various forms of acquired feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2018;20:578–592.
29. Pedersen NC, et al. Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2015;21:271–291.
30. Porter R, et al. Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. *Vet Res* 2014;45:48.
31. Rimens FA, et al. A miRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Virol Methods* 2005;124:113–116.
32. Slawson DH, Pfen JP. Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc* 1972;160:728–734.
33. Tammes R, et al. Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline antisera or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;49:177–183.
34. Vennema H, et al. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline astroviruses. *Virology* 1998;243:130–137.

V. DISKUSSION

FIP tritt besonders in Haushalten mit mehreren Katzen häufig auf. Etwa 5-12 % der mit FCoV infizierten Katzen in Mehrkatzenhaushalten entwickeln im Laufe ihres Lebens FIP (ADDIE und JARRETT, 1992). Nach der „internal mutation theory“ kommt es in der FCoV-infizierten Katze zur Mutation von FCoV und einer daraus resultierenden überschießenden Immunantwort, die letztendlich zur Krankheit führt (VENNEMA et al., 1998; BORSCHENSKY und REINACHER, 2014).

Neue experimentelle Studien geben Hoffnung, dass zukünftig eine kausale Therapie möglich sein könnte. Zu den zuletzt erprobten Medikamenten gehört vor allem das kürzlich entwickelte Nukleosid-Analogon GS-441524, mit dessen Hilfe die Replikation von FIP-auslösendem FCoV sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei experimentell induzierter FIP verhindert werden konnte (MURPHY et al., 2018). Anschließend wurde es sehr erfolgreich zur Therapie von Katzen mit natürlicher FIP eingesetzt (PEDERSEN et al., 2019). Auch Protease-Inhibitoren wurden in der Vergangenheit sowohl bei Katzen mit experimentell induzierter FIP als auch bei Katzen mit Feldinfektion verwendet und führten zumindest zu einer deutlichen Verlängerung der Überlebenszeit der erkrankten und therapierten Katzen (KIM et al., 2016; PEDERSEN et al., 2018).

Ein Schwerpunkt der FIP-Forschung liegt weiterhin im Bereich der Diagnostik. Der Goldstandard in der FIP-Diagnostik ist die IHC in verändertem Organgewebe (TAMMER et al., 1995). Diese Methode ist jedoch aufgrund des meist notwendigen operativen Eingriffs zur Probengewinnung bei einem ohnehin kranken Tier oft nicht möglich (ADDIE et al., 2004). Leichter gewinnbare Substrate, wie Ergussflüssigkeit oder Blut, werden daher oft für diagnostische Tests verwendet.

Studien zu verschiedenen RT-PCR ergaben für den Nachweis von FCoV im Serum bei Tieren mit FIP eine Sensitivität von 15 % (DOENGES et al., 2017) bis 53 % (HARTMANN et al., 2003). Die Sensitivität im Plasma lag geringfügig höher bei 71 % (EGBERINK et al., 1995). Die Spezifität des Nachweises von FCoV-RNA lag im Serum zwischen 88 und 100 % (HARTMANN et al., 2003; DOENGES et al., 2017) und im Plasma bei 89 % (EGBERINK et al., 1995). Dies bedeutet, dass der Nachweis von FCoV-RNA im Blut mittels RT-PCR nicht zur Diagnosestellung geeignet ist, da auch Katzen ohne FIP ein positives Testergebnis aufweisen können.

Die RT-PCR aus Ergussflüssigkeit hatte eine deutlich höhere Sensitivität mit 85 bis 89 % (DOENGES et al., 2017; LONGSTAFF et al., 2017). Ergussflüssigkeit ist daher wesentlich besser geeignet für den Nachweis viraler RNA als Blut.

Das Testen auf Vorhandensein von FCoV-Antikörpern im Blut, obwohl noch oft in der Praxis verwendet, ist nicht zur Diagnosestellung geeignet, da Antikörper bei Infektion mit FCoV unabhängig von der Entwicklung einer FIP gebildet werden (PEDERSEN et al., 1981b; MELI et al., 2004). Auch die oft in der Praxis durchgeführte Rivalta-Probe aus Erguss kann nicht als sicheres, alleiniges Diagnostikum verwendet werden (FISCHER et al., 2012).

Für den Nachweis von FCoV-Antigen mittels Immunfluoreszenz in Ergussflüssigkeit wurde lange Zeit eine Spezifität von 100 % angenommen (PARODI et al., 1993; PALTRINIERI et al., 1999; HARTMANN et al., 2003). Neuere Studien ermittelten jedoch nur Spezifitäten von 71 bis 72 % (LITSTER et al., 2013; FELTEN et al., 2017). Damit ist ein positives Testergebnis nicht zuverlässig für die Diagnose einer FIP.

Vor kurzem wurde eine diskriminierende RT-qPCR zum Nachweis mutierter FCoV entwickelt, die mittlerweile kommerziell erhältlich ist (FIPV RealPCR™, IDEXX Laboratories (IDEXX REFERENCE LABORATORIES, 2015)). Das Verfahren basiert auf der Detektion der beiden zuvor beschriebenen Nukleotid-Mutationen an Position 23531 und 23537 im S-Gen des Virus und erlaubt so eine Unterscheidung in FCoV mit und ohne S-Gen-Mutationen (CHANG et al., 2012). In den beiden durchgeführten Studien dieser Arbeit wurden sowohl Kammerwasser als auch paraffiniertes Gewebe auf das Vorhandensein von mutierten und nicht-mutierten FCoV untersucht. Zunächst erfolgte eine RT-qPCR, welche das 7b-Gen jeglicher FCoV nachweist (im Folgenden als 7b-RT-PCR bezeichnet), weiterhin wurden die FCoV-positiven Proben mittels diskriminierender RT-qPCR untersucht, welche die beschriebenen S-Gen-Mutationen nachweist (im Folgenden S-RT-PCR genannt). Wenn im Folgenden von mutiertem und nicht-mutiertem FCoV die Rede ist, so handelt es sich stets um FCoV mit oder ohne S-Gen-Mutationen.

Die erste Studie diente dem Nachweis von mutiertem sowie nicht-mutiertem FCoV in paraffiniertem Gewebe von 34 Katzen mit FIP und 30 Kontrolltieren. Die Proben wurden mittels 7b-RT-PCR untersucht und im positiven Fall wurde mittels S-RT-PCR eine Differenzierung in mutiertes oder nicht-mutiertes Virus vorgenommen.

Ziel der Studie war es herauszufinden, inwiefern das Vorhandensein der Substitutionen M1058L und S1060A eine Rolle bei der Entstehung der FIP spielt oder lediglich ein Indiz für eine systemische Verbreitung des Virus darstellt, wie 2014 postuliert (PORTER et al., 2014).

Die zweite Studie beschäftigte sich mit dem Nachweis von FCoV im Kammerwasser von 31 Katzen mit FIP sowie von 27 Kontrolltieren. Die Kammerwasserpunktion wird zu diagnostischen Zwecken genutzt, kann leicht *ante mortem* durchgeführt werden und ist bei korrekter Durchführung in der Regel komplikationslos (LINN-PEARL et al., 2015). Kammerwasser wurde durch Punktion der vorderen Augenkammer am temporalen Limbus mit einer 22 G-Nadel gewonnen. Die Kammerwasserproben wurden bei -80° C eingefroren und mittels 7b-RT-PCR auf das Vorhandensein von FCoV untersucht. Waren die Proben positiv, fand mittels S-RT-PCR eine Differenzierung in mutiertes oder nicht mutiertes Virus statt. Kammerwasser von 25 Tieren mit FIP sowie von elf Kontrolltieren wurde zusätzlich mittels ICC untersucht. Ziel der Studie war es, Kammerwasser als geeignetes Probenmaterial für die FIP-Diagnostik zu evaluieren.

FIP wurde bei allen Tieren beider Studien in einer Sektion und mittels positiver IHC in Gewebsläsionen bestätigt. Bei allen Kontrolltieren beider Studien wurde FIP mittels Sektion und negativer IHC ausgeschlossen. Alle Kontrolltiere der ersten Studie zeigten mindestens einen klinischen oder labordiagnostischen Parameter vereinbar mit einer FIP. Bei allen Tieren mit Uveitis wurde in der zweiten Studie eine IHC vom Auge durchgeführt.

Die Spezifität der S-RT-PCR und damit des Nachweises von mutiertem FCoV in paraffiniertem Gewebe lag bei 100 %. Damit wurden alle Katzen, die nicht an FIP erkrankt waren, auch als solche erkannt. Eine hohe Spezifität ist insofern essentiell, als eine Euthanasie der betroffenen Katze aufgrund eines falsch-positiven Ergebnisses mit hoher Wahrscheinlichkeit vermieden wird. FCoV wurde bei drei Tieren der Kontrollgruppe in paraffiniertem Gewebe festgestellt, allerdings lag es in sehr geringer Menge vor. Eine Differenzierung in mutiertes oder nicht-mutiertes Virus war somit nicht möglich und die drei Proben wurden in der Auswertung der S-RT-PCR daher als negativ eingestuft. Bei den drei FCoV-positiven Tieren der Kontrollgruppe handelte es sich um eine Katze mit einem parafalxialen Meningeom, eine Katze mit lymphozytärer Meningoenzephalitis und eine Katze

mit Salmonellose. Bei beiden Tieren mit Beteiligung des ZNS waren Histologie und IHC des Gehirns unauffällig bezüglich einer möglichen FIP. Eine FIP ist bei diesen Tieren daher sehr unwahrscheinlich, da die Detektion von intrazellulärem Virusantigen mittels IHC als Goldstandard angesehen wird und eine hohe Sensitivität aufweist (TAMMER et al., 1995; RISSI, 2018). Allerdings kann ein sehr frühes Stadium einer FIP nicht ausgeschlossen werden, da lediglich ein kleiner Teil des veränderten Gewebes mittels IHC untersucht wird. Aufgrund einer möglichen ungleichmäßigen Verteilung von FCoV im Gewebe kann daher eine falsch-negative IHC-Färbung nicht ausgeschlossen werden.

Es ist auch möglich, dass bei den drei Kontrolltieren nicht-mutiertes FCoV vorlag, welches systemisch verbreitet wurde. In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass FCoV auch bei Katzen ohne klinische Anzeichen von FIP in Kot, Blut und Gewebe nachweisbar ist (HERREWEGH et al., 1995b; ADDIE und JARRETT, 2001; KIPAR et al., 2006; CAN-ŞAHNA et al., 2007; KIPAR et al., 2010; DESMARETS et al., 2016) und in parenchymalen Zellen und/oder organspezifischen Makrophagen persistieren kann (STODDART und SCOTT, 1989; KIPAR et al., 2010). FCoV-RNA wurde bei experimentell mit FCoV infizierten SPF-Katzen ohne FIP mittels RT-qPCR in verschiedenen Organen, wie Colon, Leber, Mesenteriallymphknoten, Ileum, Jejunum und Nieren, nachgewiesen (KIPAR et al., 2010).

Da in keiner der Kammerwasserproben der Kontrollgruppe FCoV nachgewiesen werden konnte, war die Bestimmung der Spezifität der S-RT-PCR nicht möglich.

Die Spezifität des Nachweises von Virusantigen in Makrophagen im Kammerwasser mittels ICC betrug lediglich 80,0 %. Eine Kontrollkatze wurde von der Statistik ausgeschlossen, da bei der ICC keine Zellen mehr auf dem Objektträger nachweisbar waren. Bei zwei Kontrolltieren kam es zu einem falsch-positiven Ergebnis. Bei diesen beiden Katzen wurden in der Sektion neoplastische Erkrankungen (pulmonales Adenokarzinom bzw. Lymphom) diagnostiziert. Da in beiden Kammerwasser-Proben Melaningranula vorhanden waren, ist eine falsch-positive Interpretation aufgrund der Ähnlichkeit mit dem dunkelbraun gefärbten Chromogen der ICC denkbar. Durch eine zusätzliche immunologische Markierung ausschließlich der Makrophagen in der ICC hätte eine mögliche falsch-positive Wertung unspezifisch gefärbter Zellen eventuell verhindert werden können (LITSTER et al., 2013). Schließlich kann auch das Vorliegen einer frühen Form der

FIP bei den Katzen mit falsch-positivem Ergebnis nicht komplett ausgeschlossen werden, obwohl die Histologie keinerlei Hinweis diesbezüglich lieferte. Auch das Vorhandensein und Anfärben nicht-mutierter FCoV ist möglich, da die Verbreitung des nicht-mutierten Virus nicht auf den Magen-Darm-Trakt beschränkt ist und bereits in diversen Organen gesunder Katzen nachgewiesen wurde (KIPAR et al., 2010). Dagegen spricht jedoch, dass bei beiden Tieren kein FCoV in der 7b-RT-PCR des Kammerwassers festgestellt wurde.

Die Sensitivität der 7b-RT-PCR bezogen auf den Nachweis von jeglichem FCoV im Gewebe von Katzen mit FIP betrug 94,1 % in dieser Studie. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien zum Nachweis von FCoV aus Gewebe von Katzen mit FIP. Eine Studie von 1994 zeigte eine Sensitivität der RT-PCR von 87,5 %, wobei allerdings keine IHC durchgeführt und FIP vornehmlich anhand der Klinik diagnostiziert wurde (LI und SCOTT, 1994). Aktuellere Studien untersuchten Gewebe von IHC-positiven Tieren mit FIP mittels einer RT-qPCR und ermittelten eine Sensitivität von 90 % oder 95 % (PORTER et al., 2014; BARKER et al., 2017).

Die Sensitivität der 7b-RT-PCR im Kammerwasser betrug 35,5 % und war damit, verglichen mit der Sensitivität der 7b-RT-PCR im Gewebe, sehr niedrig. Bei lediglich 11/31 Katzen mit FIP wurde FCoV im Kammerwasser detektiert. Bislang wurden noch keine RT-qPCR-basierten Studien bezüglich des Gehaltes von FCoV in Kammerwasser durchgeführt. Allerdings konnten Pathogene, wie *Bartonella spp.* (JINKS et al., 2016), *Toxoplasma gondii* (LAPPIN et al., 1996) und felines Herpesvirus-1 (FHV-1) (MAGGS et al., 1999; POWELL et al., 2010), im Kammerwasser von Katzen mit infektiöser Uveitis nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache für die niedrige Sensitivität der 7b-RT-PCR kann das Fehlen von entzündlichen Veränderungen an den Augen der Katzen in dieser Studie sein, da eine Entzündung den Übertritt von Zellen in das Kammerwasser zu begünstigen scheint (MAGGS et al., 1999). In der hier durchgeführten Studie war lediglich bei 2/11 Tieren, in deren Kammerwasser FCoV festgestellt wurde, histologisch eine Uveitis nachweisbar. Damit wurde FCoV-RNA bei den restlichen neun Tieren detektiert, ohne dass eine klinisch erkennbare Uveitis vorhanden war. Da jedoch von diesen Tieren keine Histologie des Auges angefertigt wurde, kann eine Entzündung auf histologischer Ebene nicht ausgeschlossen werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie fanden sich bei 11/12 Katzen mit schwerer systemischer Erkrankung Entzündungszellen im Kammerwasser, obwohl klinisch

keinerlei Hinweise auf eine Uveitis vorlagen (FELTEN et al., 2018). Damit scheint auch eine schwere Grunderkrankung zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Kammerwasser-Schranke mit Austritt von Zellen in das Kammerwasser führen zu können. Da FIP eine schwere systemische Entzündungsreaktion auslöst (BORSCHENSKY und REINACHER, 2014), wäre dies eine denkbare Erklärung für die vorhandene FCoV-RNA.

Die Sensitivität der S-RT-PCR im Gewebe betrug 70,6 % und lag damit unter den Ergebnissen vorheriger Studien von 95,8 % (CHANG et al., 2012) und 80,9 % (BARKER et al., 2017) für den Nachweis von FCoV mit S-Gen-Mutationen. Im Kammerwasser betrug die Sensitivität der S-RT-PCR lediglich 12,9 %.

Bei 24/34 Tieren mit FIP wurde mutiertes FCoV im Gewebe detektiert. Die Substitution M1058L im S-Protein lag bei 23/24 Tieren vor. Ein Tier zeigte sowohl mutiertes als auch nicht-mutiertes FCoV in der Gewebeprobe. Bei keiner der Proben wurde die Substitution S1060A gefunden. Dass die Substitution M1058L dominiert, fiel bereits in der Originalstudie aus den Niederlanden auf, in der sie in 108/113 Proben vorhanden war (CHANG et al., 2012). Auch die vor kurzem veröffentlichte Studie von Barker et al. fand in der Mehrzahl der FCoV mit Mutation (186/190) diese Substitution in den vorliegenden Gewebeproben.

Bei einer Katze mit FIP wurde mittels 7b-RT-PCR und S-RT-PCR eine Mischinfektion mit sowohl mutiertem als auch mit nicht-mutiertem FCoV in Kammerwasser und Gewebe nachgewiesen. Auch die vor kurzem publizierte Studie von Barker et al. detektierte sowohl mutiertes als auch nicht-mutiertes FCoV in zehn Gewebeproben von insgesamt drei Tieren mit FIP (BARKER et al., 2017). Eine mögliche Erklärung für das Vorliegen von sowohl mutiertem als auch nicht-mutiertem FCoV wäre eine Superinfektion mit enteralem FCoV bei bestehender FIP. Eine enterale Superinfektion wurde bei Tieren mit FIP beschrieben (CHANG et al., 2010) und da nachweislich auch nicht-mutierte FCoV in Monozyten über das Blutssystem in verschiedene Gewebe gelangen können (KIPAR et al., 2010), ist ein gleichzeitiger Nachweis von mutierten und nicht-mutierten FCoV-Stämmen durchaus denkbar. Eine weitere mögliche Erklärung für das Auftreten einer Mischinfektion wäre das Vorliegen einer Art Zwischenstadium bei den betreffenden Tieren, wobei zum Zeitpunkt der Untersuchung sowohl bereits mutiertes FCoV als auch noch das ursprüngliche nicht-mutierte FCoV im Körper zirkulierte.

Im Kammerwasser wurde lediglich bei 3/31 Proben von Katzen mit FIP die Aminosäuresubstitution M1058L detektiert. Bei einer weiteren Katze fand sich, wie oben erwähnt, sowohl mutiertes als auch nicht-mutiertes FCoV in der Kammerwasserprobe. Die Substitution S1060A lag in keiner der Proben vor. Interessanterweise zeigten keine der S-RT-PCR-positiven Katzen klinische Symptome einer Uveitis, sodass der Übertritt von FCoV-haltigen Makrophagen auch ohne sichtbaren lokalen Entzündungsprozess stattgefunden haben muss. Dies wird bestätigt durch die positive ICC, die bei zwei der Katzen mit der Aminosäuresubstitution M1058L vorlag. Bei der dritten Katze mit der Aminosäuresubstitution M1058L befand sich kein zelluläres Material mehr auf dem Objektträger, woraufhin diese von der Statistik ausgeschlossen wurde. Bei der Katze mit sowohl mutiertem als auch nicht-mutiertem FCoV war leider keine ICC aus Kammerwasser verfügbar.

Die Sensitivität der ICC im Kammerwasser betrug 62,5 %. Vergleichbare Studien zum Nachweis von FCoV-Antigen mittels Immunfluoreszenz aus Körperflüssigkeiten bei Tieren mit FIP existieren für Aszites und Liquor. FCoV-Antigen wird hierbei unter Verwendung fluoreszierender Antikörper in Makrophagen sichtbar gemacht (PARODI et al., 1993). Die Sensitivität des Nachweises von FCoV-Antigen mittels Immunfluoreszenz in Ergussflüssigkeit wurde bisher mit Werten von 57 % (HARTMANN et al., 2003), 69 % (HIRSCHBERGER et al., 1995) und 85 % (FELTEN et al., 2017) bis hin zu 95 % (PALTRINIERI et al., 1999) angegeben, wobei eine neuere Studie sogar eine Sensitivität von 100 % erzielte (LITSTER et al., 2013). Eine Studie zur ICC im Liquor von Katzen mit FIP (mit und ohne neurologische Symptome) ergab eine Sensitivität von 85 % (GRUENDL et al., 2017). Die erreichte Sensitivität in der vorliegenden Studie ist mit 62,5 % damit eher gering. Ursache dafür könnte eine an sich geringe Menge an Makrophagen oder FCoV im Kammerwasser sein. Des Weiteren wurde eine Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen im Erguss von Katzen mit FIP beschrieben (HARTMANN et al., 2003). Durch Immunkomplexbildung könnte der Nachweis von Virus mittels ICC erschwert sein. Das Vorhandensein von Antigen-Antikörper-Komplexen im Kammerwasser von Katzen mit FIP wurde bisher noch nicht untersucht. Ein Mangel an Antigen in Kammerwasserproben bei gleichzeitig vorhandenen Antikörpern wurde jedoch bei Hunden mit infektiöser caniner Hepatitis mit cornealen Läsionen demonstriert

(CARMICHAEL, 1964). Möglicherweise gelangen Antikörper durch entzündete Gefäße in das Kammerwasser und binden hier virales Antigen. Allerdings ist auch eine lokale Antikörperproduktion möglich. Der Nachweis einer großen Anzahl an Plasmazellen im Bereich von Limbus und iridalen Blutgefäßen bei Hunden mit infektiöser caniner Hepatitis, zusammen mit dem Nachweis spezifischer Antikörper in derselben Gegend, unterstützt diese Annahme (CARMICHAEL, 1964).

Auch die Aufbewahrungsdauer kann den Nachweis viraler RNA oder viralen Antigens beeinträchtigen. In einer Studie zur Diagnostik von FIP mittels Immunfluoreszenz wurde Aszites von Tieren mit bestätigter FIP in zeitlichen Abständen wiederholt auf Antigen getestet (LITSTER et al., 2013). Bei zunehmender Zeit zwischen Probenentnahme und Testdurchführung sank auch die Sensitivität des Tests. Dabei war FCoV-Antigen in Proben, die bei 4 °C aufbewahrt wurden, höchstens 13 Tage lang nachweisbar (LITSTER et al., 2013).

Die Sensitivität der ICC aus Kammerwasser lag deutlich über der Sensitivität der S-RT-PCR. Jedoch konnten zur Berechnung der Sensitivität der ICC nur 24 Katzen mit FIP herangezogen werden. Dies limitiert den Vergleich mit der S-RT-PCR. Die höhere Sensitivität ist dennoch insofern erstaunlich, als die RT-qPCR generell als sehr sensitives Diagnostikverfahren gilt und bereits kleinste Mengen Genmaterial ausreichen, um ein positives Ergebnis zu erzielen. Der RNA-Nachweis mittels 7b-RT-PCR war bei neun FIP-Katzen der Studie negativ, die aber in denselben Proben ICC-positiv waren. Möglicherweise ist die freie RNA im Kammerwasser empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen als das zellgebundene FCoV-Antigen in Makrophagen. Eine negative Beeinflussung des Nachweises von FCoV-RNA durch Dauer und Temperatur der Lagerung ist möglich. Eine Studie zum Nachweis von Zika-Viren mittels RT-qPCR in Urin ergab eine signifikante Reduktion nachweisbarer RNA in Proben, die bei -80 °C über einen Zeitraum von zehn Tagen eingefroren wurden und von vornherein bereits eine niedrige Viruslast aufwiesen. Das Einfrieren von Proben bei -80 °C über einen Zeitraum von drei Tagen hingegen beeinflusste den Nachweis von RNA nicht signifikant. Proben mit hoher Viruslast (5.0 log₁₀ Kopien/ml) zeigten keine Beeinträchtigung des Nachweises von RNA bei Lagerung über einen Zeitraum von 30 Tagen (TAN et al., 2017).

Bei 7/34 Gewebeproben und 7/31 Kammerwasserproben von Tieren mit FIP wurde mittels 7b-RT-PCR FCoV-RNA nachgewiesen, eine Genotypisierung war aber aufgrund der niedrigen viralen Konzentration nicht möglich (below limit of

detection, BLD). Die Proben zweier Tiere wurden sowohl im Kammerwasser als auch im Gewebe als BLD eingestuft. Eine mögliche Ursache für die geringe Konzentration an FCoV-RNA in Kammerwasser wäre die oben bereits beschriebene Reduktion des Virusgehalts aufgrund der Lagerung der Proben bei -80 °C. Befanden sich in den betroffenen Proben von Anfang an wenig Viruspartikel, könnte dies den späteren Nachweis von RNA möglicherweise beeinträchtigt haben. Auch eine fehlende Involvierung des Auges in den Krankheitsprozess und damit fehlendes Virus im Kammerwasser ist in Betracht zu ziehen. Ein möglicher Grund für die teilweise geringe Viruslast im Gewebe wäre eine zu lange Fixation in Formaldehyd vor der Einbettung in Paraffin. Dies würde die Extraktion intakter FCoV-RNA erschweren. Da in dieser Studie Proben weniger als 72 h in Formaldehyd gelagert und anschließend sofort in Paraffin eingebettet wurden, erscheint dies sehr unwahrscheinlich. Auch die Lagerung in Formaldehyd an sich könnte die Menge an nachweisbarer FCoV-RNA verringern. Bei Katzen mit experimentell induzierter FIP konnte zwar beim Nachweis von FCoV-RNA mittels PCR zwischen frischem und Formaldehyd-fixiertem Gewebe kein Unterschied festgestellt werden (LI und SCOTT, 1994), die Menge an extrahierbarer RNA im fixierten Gewebe fiel jedoch deutlich niedriger aus als im frischen Zustand.

In einer Gewebeprobe einer Katze mit FIP war mit der S-RT-PCR keine Differenzierung möglich, obwohl mittels 7b-RT-PCR eine hohe Konzentration an FCoV gefunden wurde. Als Ursache kämen das Vorliegen eines bisher unbekannten FCoV-Stamms oder Sequenzvariationen im S-Gen in Frage. Eine andere Erklärung wäre das Vorhandensein eines FCoV-Serotyp-II, da die verwendeten Primer spezifisch für FCoV-Serotyp-I sind.

In zwei Gewebeproben von Katzen mit FIP wurde mittels 7b-RT-PCR keine FCoV-RNA detektiert. Alle Katzen hatten eine positive IHC, histologisch mit FIP zu vereinbarende Gewebeläsionen und zeigten typische klinische Symptome für FIP. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Gewebeproben von Katzen mit FIP, welche nicht aus Bereichen mit typischen histologischen Veränderungen stammen, eine negative RT-qPCR oder eine entsprechend niedrigere Viruslast aufweisen können (BARKER et al., 2017). Damit kann eine unregelmäßige Verteilung der FCoV-haltigen Zellen im Gewebe angenommen werden, die folglich zu einem falsch-negativen Ergebnis der 7b-RT-PCR führen kann. In 20 Kammerwasserproben von Katzen mit durch IHC bestätigter FIP wurde ebenfalls

mittels 7b-RT-PCR keine FCoV-RNA nachgewiesen. Dies kann auf das bereits diskutierte Fehlen von entzündlichen Augenveränderungen zurückzuführen sein, da das Vorliegen einer Uveitis den Übertritt von Pathogenen in das Kammerwasser zu begünstigen scheint (LAPPIN et al., 1996; POWELL et al., 2010; JINKS et al., 2016). Letztendlich ist auch eine falsch-positive IHC durch Verunreinigung während des Färbeprozesses nicht völlig auszuschließen. Die FIP-typischen histopathologischen Veränderungen sowie die entsprechende Klinik bei den betroffenen Tieren sprechen jedoch dagegen.

Eine Limitation beider Studien ist der Mangel an Kontrolltieren mit nicht-mutiertem FCoV im Gewebe oder Kammerwasser. In keiner der Kammerwasserproben und lediglich drei der Gewebeproben von Kontrolltieren wurde FCoV mittels 7b-RT-PCR gefunden. Somit lässt sich keine Aussage über mögliche S-Gen-Mutationen bei Tieren mit FCoV, aber ohne FIP treffen. Die Spezifität der S-RT-PCR zum Nachweis von mutiertem FCoV im Kammerwasser konnte aufgrund des Fehlens von FCoV-positiven Kammerwasserproben in der Kontrollgruppe erst gar nicht bestimmt werden.

In beiden Studien wurden die Proben *post mortem* entnommen. Im Gegensatz zur Studie von Barker et al. (2017) konnten in der ersten Studie die einzelnen Organe nicht separat nach Vorhandensein von mutierten und nicht-mutierten FCoV untersucht werden. Die verwendeten Paraffinblöcke enthielten Gewebeproben verschiedener Organe, und eine Untersuchung einzelner Gewebe war nicht möglich. Durch eine separate Untersuchung wären ein Vergleich der Virusbelastung verschiedener Gewebe derselben Katze sowie ein Vergleich der Tiere untereinander möglich gewesen. Dauer und Temperatur der Lagerung der Proben (sowohl Gewebe als auch Kammerwasser) kann die Sensitivität möglicherweise negativ beeinflusst haben, da FCoV-RNA außerhalb des Körpers sehr empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen ist und leicht zerstört werden kann (ADDIE und JARRETT, 2001).

Die Haupt-Limitation im Hinblick auf die zweite Studie ist das Vorhandensein einer zu geringen Anzahl an Katzen mit Uveitis. Da Katzen mit FIP eine hohe Viruslast in betroffenem Gewebe aufweisen sowie bei Katzen mit Uveitis von einem Übertritt von Pathogenen in das Kammerwasser berichtet wurde (LAPPIN et al., 1996; POWELL et al., 2010; PEDERSEN et al., 2015; JINKS et al., 2016), wäre bei Tieren mit Uveitis das Vorhandensein von FCoV-RNA im Kammerwasser zu

erwarten gewesen.

Die S-RT-PCR im Gewebe ergab eine Spezifität von 100 %. Dies ist insofern wichtig, als die Spezifität der wichtigste Parameter in der FIP-Diagnostik ist, um eine Euthanasie von nicht an FIP erkrankten Tieren zu verhindern. In beiden Studien wurden nur bei Tieren mit FIP S-Gen-Mutationen festgestellt. Dabei wurde ausschließlich die Aminosäuresubstitution M1058L nachgewiesen, die Substitution S1060A konnte in keiner der Proben in dieser Studie festgestellt werden. Die S-RT-PCR aus paraffiniertem Gewebe war damit im positiven Fall beweisend für das Vorliegen einer FIP in dieser Studie, allerdings kann ein Vorkommen von S-Gen-Mutationen bei Katzen ohne FIP aufgrund der mangelnden Anzahl FCoV-positiver Katzen in der Kontrollgruppe nicht völlig ausgeschlossen werden. Da nicht-mutierte FCoV-RNA auch im Gewebe von gesunden Tieren detektiert wurde, bestätigt dies die Fähigkeit des Virus zur systemischen Verbreitung. Kammerwasser eignet sich aufgrund der niedrigen Sensitivität von 12,9 % nicht als Probenmaterial für die S-RT-PCR. Auch die ICC im Kammerwasser ist aufgrund einer relativ geringen Sensitivität sowie falsch-positiver Ergebnisse nur eingeschränkt zu empfehlen. Weitere Studien mit Probenentnahmen von einzelnen Geweben, auch im frischen Zustand, sowie mehr Kammerwasserproben von Tieren mit vorhandener Uveitis sollten in Betracht gezogen werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Feline infektiöse Peritonitis (FIP) ist eine weltweit verbreitete Erkrankung der Feliden. Ausgelöst wird die Krankheit durch das feline Coronavirus (FCoV), ein an sich harmloser Durchfallerreger, welcher in der Katze zum tödlichen Virus mutiert. Ort und Anzahl der Mutation(en) sind Gegenstand vieler Studien über FIP. Zwei Mutationen im FCoV-Spike-Gen (S-Gen), die zu den zwei Aminosäuresubstitutionen M1058L (Methionin zu Leucin) und S1060A (Serin zu Alanin) im Spike-Protein führen, wurden als ursächlich für die Entstehung von FIP postuliert. Jedoch wurde die Aminosäuresubstitution M1058L vor kurzem auch in Gewebe von Katzen ohne FIP gefunden, was die Rolle der Mutation als Auslöser für FIP in Frage stellt. Goldstandard der Diagnostik ist weiterhin die Immunhistochemie (IHC) aus dem Gewebe betroffener Tiere. Dies setzt eine invasive Probenentnahme für ein bereits geschwächtes Tier voraus. Um bereits eine Diagnose *ante mortem* stellen zu können, wurde eine mittlerweile kommerziell erhältliche, quantitative reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) entwickelt, welche anhand der S-Gen-Mutationen zwischen mutiertem und nicht-mutiertem FCoV unterscheiden soll (S-RT-PCR).

Ziel der ersten Studie war es, festzustellen, inwiefern die beiden Aminosäuresubstitutionen im Spike-Protein mit dem Auftreten von FIP korrelieren. Mittels diskriminierender RT-qPCR wurde paraffiniertes Gewebe sowohl von Katzen mit FIP als auch von Kontrolltieren zunächst auf das Vorhandensein von FCoV (mittels 7b-RT-PCR) sowie, in einem zweiten Schritt, auf Mutationen im S-Gen (mittels S-RT-PCR) untersucht. Alle Katzen mit FIP wiesen histopathologisch typische Veränderungen auf und waren positiv in der IHC. Alle Kontrolltiere zeigten mindestens einen FIP-typischen klinischen oder labordiagnostischen Parameter. Die histopathologische Untersuchung sowie die IHC ergaben jedoch bei allen Kontrolltieren keinen Hinweis auf FIP. Die Spezifität der S-RT-PCR im Gewebe betrug 100 %. Bei 23/34 Tieren mit FIP wurde die Aminosäuresubstitution M1058L nachgewiesen. Bei einem Tier mit FIP wurde sowohl mutiertes als auch nicht-mutiertes Virus detektiert. Dies resultierte in einer akzeptablen Sensitivität der S-RT-PCR von 70,6 %. Eine Probe einer Katze mit FIP konnte trotz hoher Viruslast nicht genotypisiert werden. Mögliche Ursachen dafür könnten bisher unbekannte Sequenzvariationen im S-Gen oder eine Infektion mit FCoV-Serotyp-

II gewesen sein. In der ersten Studie korrelierte damit das Auftreten der Aminosäuresubstitution M1058L mit dem Auftreten von FIP. FCoV wurde in geringer Menge in Gewebe von Kontrolltieren gefunden, aufgrund der niedrigen Viruslast konnte jedoch nicht bestimmt werden, ob es sich um mutiertes oder nicht-mutiertes FCoV handelte. Dies bestätigte die Beobachtung vorheriger Studien bezüglich des systemischen Vorkommens von FCoV auch bei Katzen ohne FIP.

Ziel der zweiten Studie war die Untersuchung von Kammerwasser auf das Vorhandensein von FCoV-RNA und FCoV-Antigen bei Katzen mit FIP und Kontrolltieren und damit die Evaluation eines potentiellen Nutzens von Kammerwasser in der FIP-Diagnostik. Mittels diskriminierender RT-qPCR (7b-RT-PCR und S-RT-PCR) wurde das Kammerwasser zum einen auf das Vorhandensein von mutiertem und nicht-mutiertem FCoV untersucht, zum anderen wurde bei einem Teil der Tiere eine Immunzytochemie (ICC) zum Nachweis von FCoV-Antigen in Makrophagen durchgeführt. Bei allen Tieren mit FIP wurde die Erkrankung mittels Histologie sowie positiver IHC bestätigt und bei allen Kontrolltieren mittels Histologie und negativer IHC ausgeschlossen. Die Spezifität der 7b-RT-PCR zum Nachweis mutierter und nicht-mutierter FCoV im Kammerwasser betrug 100 %. Da bei keiner Kontrollkatze FCoV im Kammerwasser nachweisbar war, konnte die S-RT-PCR nicht durchgeführt werden und die Spezifität der S-RT-PCR war damit nicht beurteilbar. Die Sensitivität der 7b-RT-PCR betrug 35,5 %, die Sensitivität der S-RT-PCR lag lediglich bei 12,9 %. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre das mangelnde Vorliegen an entzündlichen Augenveränderungen, die einen Übertritt von Virus aus den Blutgefäßen in das Kammerwasser begünstigen könnten. Obwohl die 7b-RT-PCR keine falsch-positiven Ergebnisse lieferte, eignet sich die Untersuchung von Kammerwasser mittels RT-qPCR daher aufgrund der niedrigen Sensitivität nicht zur Diagnostik von FIP. Verglichen mit den Ergebnissen der 7b- und S-RT-PCR, erzielte die ICC die beste Sensitivität mit 62,5 %. Da zwei Tiere der Kontrollgruppe in der ICC falsch-positiv waren, betrug die Spezifität jedoch lediglich 80,0 %. Die wahrscheinlichste Erklärung für die falsch-positiven Ergebnisse ist das Anfärben von systemisch vorkommendem, wenig pathogenem FCoV oder sogar das Vorliegen einer frühen FIP. Da die Spezifität bei einer tödlich verlaufenden Erkrankung wie FIP der wichtigste diagnostische Parameter ist, ist auch die ICC in Kammerwasser für eine definitive Diagnosestellung nicht geeignet.

VII. SUMMARY

Feline infectious peritonitis (FIP) is a globally widespread disease in felids. The illness is caused by a feline coronavirus (FCoV), which normally is a benign enteric virus that can mutate into a deadly virus within the infected cat. Detecting a possible site and number of mutations within the FCoV genome is object of many studies. Two mutations in the FCoV spike (S) gene resulting in the amino acid substitutions M1058L (methionine to leucine) and S1060A (serine to alanine) in the spike protein were postulated to be responsible for FIP. Still, the amino acid substitution M1058L was recently also found in tissues of cats without FIP, thereby questioning the hypothesis of this particular mutation causing FIP. Immunohistochemistry (IHC) performed on tissue of diseased animals is still considered the gold standard in diagnostics. Collecting tissue, however, requires invasive methods, representing a serious intervention for an already weak animal. In order to diagnose FIP *ante mortem*, a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) was commercially developed that should differentiate between mutated and non-mutated virus by detection of the mentioned S gene mutations (S-RT-PCR).

The aim of the first study was to assess whether the amino acid substitutions in the spike protein were associated with FIP. Using the discriminating real-time RT-PCR, paraffin-embedded tissue of cats with FIP and control cats was first examined for the presence of FCoV (by 7b-RT-PCR) and as a second step for the presence of mutations in the S gene (by S-RT-PCR). All cats with FIP showed typical histopathological changes and positive IHC. All control cats showed at least one clinical or laboratory parameter indicative of FIP. Histopathology as well as IHC were negative in all control cats. Specificity of the S-RT-PCR in tissue was 100%. In 23/34 cats with FIP, the amino acid substitution M1058L was detected. One cat with FIP was infected with mutated as well as non-mutated FCoV. This resulted in an acceptable sensitivity of the S-RT-PCR of 70.6%. One sample of a cat with FIP showed a high virus load, however, genotyping was not possible, suggesting unknown sequence variations of the S gene or an infection with FCoV serotype 2. In the first study, the detection of the amino acid substitution M1058L correlated with the appearance of FIP. FCoV was found in low amounts in the tissues of some control cats, but a differentiation into mutated or non-mutated FCoV was not possible due to the low virus load. This confirmed previous studies regarding the

systemic spread of FCoV in cats without FIP.

The aim of the second study was to examine aqueous humor for the presence of FCoV RNA as well as FCoV antigen in cats with FIP and controls and to evaluate its potential use in FIP diagnostics. Using the discriminating real-time RT-PCR (7b-RT-PCR and S-RT-PCR), aqueous humor was examined for mutated and non-mutated FCoV, and immunocytochemistry (ICC) was conducted in a part of the study population to detect FCoV antigen in macrophages. In all cats of the FIP group, FIP was confirmed by histopathology and positive IHC. In all control cats, FIP was excluded by histopathology and negative IHC. Specificity of 7b-RT-PCR to detect mutated as well as non-mutated FCoV in aqueous humor was 100%. As none of the control cats had FCoV-RNA detected in aqueous humor, S-RT-PCR could not be performed in control cats and thus, specificity of S-RT-PCR could not be determined. Sensitivity of 7b-RT-PCR was 35.5% and sensitivity of S-RT-PCR was only 12.9%. A possible explanation for the low sensitivity could be the lack of inflammatory ocular signs in some cats with FIP, which could otherwise facilitate the extravasation of FCoV from the systemic circulation into the aqueous humor. Even though none of the samples were false positive in 7b-RT-PCR, real-time RT-PCR of aqueous humor is not useful for diagnosing FIP as a sole diagnostic test due to the low sensitivity. Compared with the results of 7b-RT-PCR and S-RT-PCR, ICC revealed the best sensitivity with 62.5%. Still, specificity of ICC was only 80.0%, as the samples from two cats of the control group stained false positive. The most likely explanation for the false positive samples is a staining of circulating FCoV, previously demonstrated in cats without FIP, or an early stage of FIP in the two control cats. As specificity is the most important diagnostic parameter in a deadly disease like FIP, ICC of aqueous humor is also not a suitable tool to diagnose FIP.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Addie DD, Jarrett O. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *Vet Rec* 1992; 130: 133-7.

Addie DD. Clustering of feline coronaviruses in multicat households. *Vet J* 2000; 159: 8-9.

Addie DD, Jarrett O. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet Rec* 2001; 148: 649.

Addie DD, Schaap IAT, Nicolson L, Jarrett O. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *J Gen Virol* 2003; 84: 2735-44.

Addie DD, Paltrinieri S, Pedersen NC. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 125-30.

Addie DD, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 594-604.

Addie DD, McDonald M, Audhuy S, Burr P, Hollins J, Kovacic R, Lutz H, Luxton Z, Mazar S, Meli ML. Quarantine protects Falkland Islands (Malvinas) cats from feline coronavirus infection. *J Feline Med Surg* 2012; 14: 171-6.

Andrew SE. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2000; 30: 987-1000.

AnimaLabs (2016) Resistenz gegen Feline Infektiöse Peritonitis (FIPR) SENSOR. In: <http://www.animalabs.com/de/shop/katzen/resistenz-gegen-feline-infektiöse->

[peritonitis-fipr/](#)

Bank-Wolf BR, Stallkamp I, Wiese S, Moritz A, Tekes G, Thiel HJ. Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2014; 173: 177-88.

Barker EN, Tasker S, Gruffydd-Jones TJ, Tuplin CK, Burton K, Porter E, Day MJ, Harley R, Fewes D, Helps CR, Siddell SG. Phylogenetic analysis of feline coronavirus strains in an epizootic outbreak of feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2013; 27: 445-50.

Barker EN, Stranieri A, Helps CR, Porter EL, Davidson AD, Day MJ, Knowles T, Kipar A, Tasker S. Limitations of using feline coronavirus spike protein gene mutations to diagnose feline infectious peritonitis. *Vet Res* 2017; 48: 60.

Battilani M, Balboni A, Bassani M, Scagliarini A, Paltrinieri S, Prosperi S. Sequence analysis of the nucleocapsid gene of feline coronaviruses circulating in Italy. *New Microbiol* 2010; 33: 387-92.

Bell ET, Toribio J, White JD, Malik R, Norris JM. Seroprevalence study of feline coronavirus in owned and feral cats in Sydney, Australia. *Aust Vet J* 2006a; 84: 74-81.

Bell ET, Malik R, Norris JM. The relationship between the feline coronavirus antibody titre and the age, breed, gender and health status of Australian cats. *Aust Vet J* 2006b; 84: 2-7.

Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 2012; 4: 1011-33.

Benetka V, Kubber-Heiss A, Kolodziejek J, Nowotny N, Hofmann-Parisot M, Mostl K. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2004; 99:

31-42.

Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 767-804.

Borschensky CM, Reinacher M. Mutations in the 3c and 7b genes of feline coronavirus in spontaneously affected FIP cats. *Res Vet Sci* 2014; 97: 333-40.

Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, Rottier PJM. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* 2003; 77: 8801-11.

Bosch BJ, de Haan CAM, Smits SL, Rottier PJM. Spike protein assembly into the coronavirus: exploring the limits of its sequence requirements. *Virology* 2005; 334: 306-18.

Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME, O'Brien SJ. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1445-52.

Burkard C, Verheije MH, Wicht O, van Kasteren SI, van Kuppeveld FJ, Haagmans BL, Pelkmans L, Rottier PJ, Bosch BJ, de Haan CA. Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004502.

Cambi A, de Lange F, van Maarseveen NM, Nijhuis M, Joosten B, van Dijk EM, de Bakker BI, Franssen JA, Bovee-Geurts PH, van Leeuwen FN, van Hulst NF, Figdor CG. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol* 2004; 164: 145-55.

Can-Şahna K, Ataseven VS, Pınar D, Oğuzoğlu TÇ. The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *J Feline Med Surg* 2007; 9: 369-72.

- Carmichael LE. The pathogenesis of ocular lesions of infectious canine hepatitis: 1. Pathology and virological observations. *Pathol Vet* 1964; 1: 73-95.
- Cave TA, Golder MC, Simpson J, Addie DD. Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 53-8.
- Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, Rottier PJ. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol* 2010; 91: 415-20.
- Chang HW, Egberink HF, Rottier PJM. Sequence analysis of feline coronaviruses and the circulating virulent/avirulent theory. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 744-6.
- Chang HW, Egberink HF, Halpin R, Spiro DJ, Rottier PJM. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1089-95.
- Compton SR, Ball-Goodrich LJ, Johnson LK, Johnson EA, Paturzo FX, Macy JD. Pathogenesis of enterotropic mouse hepatitis virus in immunocompetent and immunodeficient mice. *Comp Med* 2004; 54: 681-9.
- Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; 422: 37-44.
- Cornelissen E, Dewerchin HL, Van Hamme E, Nauwynck HJ. Absence of surface expression of feline infectious peritonitis virus (FIPV) antigens on infected cells isolated from cats with FIP. *Vet Microbiol* 2007; 121: 131-7.
- Cornelissen E, Dewerchin HL, Van Hamme E, Nauwynck HJ. Absence of antibody-dependent, complement-mediated lysis of feline infectious peritonitis virus-infected cells. *Virus Res* 2009; 144: 285-9.
- Corse E, Machamer CE. Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi

complex and directs release of virus-like particles. *J Virol* 2000; 74: 4319-26.

de Groot-Mijnes JDF, van Dun JM, van der Most RG, de Groot RJ. Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *J Virol* 2005; 79: 1036-44.

Dean GA, Olivry T, Stanton C, Pedersen NC. In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Vet Microbiol* 2003; 97: 1-12.

Dedeurwaerder A, Desmarests LM, Olyslaegers DA, Vermeulen BL, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes. *Vet Microbiol* 2013; 162: 447-55.

Delmas B, Laude H. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol* 1990; 64: 5367-75.

Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol* 2011; 8: 270-9.

Desmarests LM, Vermeulen BL, Theuns S, Conceicao-Neto N, Zeller M, Roukaerts ID, Acar DD, Olyslaegers DA, Van Ranst M, Matthijnsens J, Nauwynck HJ. Experimental feline enteric coronavirus infection reveals an aberrant infection pattern and shedding of mutants with impaired infectivity in enterocyte cultures. *Sci Rep* 2016; 6: 20022.

Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol* 2005; 150: 2483-500.

Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Feline infectious peritonitis virus-infected monocytes internalize viral membrane-bound proteins upon antibody

addition. J Gen Virol 2006; 87: 1685-90.

Dewerchin HL, Cornelissen E, Van Hamme E, Smits K, Verhasselt B, Nauwynck HJ. Surface-expressed viral proteins in feline infectious peritonitis virus-infected monocytes are internalized through a clathrin- and caveolae-independent pathway. J Gen Virol 2008; 89: 2731-40.

Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, Fux R, Hartmann K. Comparison of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction of peripheral blood mononuclear cells, serum and cell-free body cavity effusion for the diagnosis of feline infectious peritonitis. J Feline Med Surg 2017; 19: 344-50.

Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. Annu Rev Microbiol 1997; 51: 151-78.

Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. Curr Top Microbiol Immunol 1999; 237: 97-132.

Dye C, Siddell SG. Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146. J Gen Virol 2005; 86: 2249-53.

Dye C, Siddell SG. Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. J Feline Med Surg 2007; 9: 202-13.

Egberink HF, Herrewegh AAPM, Schuurman NM, van der Linde-Sipman JS, Horzinek MC, de Groot RJ. FIP, easy to diagnose? Vet Q 1995; 17: 24-5.

Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Methods Mol Biol 2015; 1282: 1-23.

Felten S, Matiassek K, Gruendl S, Sangl L, Wess G, Hartmann K. Investigation into

the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions for diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 410-8.

Felten S, Matiasek K, Gruendl S, Sangl L, Hartmann K. Utility of an immunocytochemical assay using aqueous humor in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Ophthalmol* 2018; 21: 27-34.

Fernandez-Segura E, Garcia JM, Campos A. Topographic distribution of CD18 integrin on human neutrophils as related to shape changes and movement induced by chemotactic peptide and phorbol esters. *Cell Immunol* 1996; 171: 120-5.

Fischer Y, Sauter-Louis C, Hartmann K. Diagnostic accuracy of the Rivalta test for feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol* 2012; 41: 558-67.

Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J Am Vet Med Assoc* 1997a; 210: 1313-8.

Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC. Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *J Am Vet Med Assoc* 1997b; 210: 1307-12.

Foley JE, Lapointe JM, Koblik P, Poland A, Pedersen NC. Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 415-23.

Gelatt KN. Iridocyclitis-panophthalmitis associated with feline infectious peritonitis. *Vet Med Small Anim Clin* 1973; 68: 56-7.

Goitsuka R, Ohashi T, Ono K, Yasukawa K, Koishibara Y, Fukui H, Ohsugi Y, Hasegawa A. IL-6 activity in feline infectious peritonitis. *J Immunol* 1990; 144: 2599-603.

Golovko L, Lyons LA, Liu H, Sorensen A, Wehnert S, Pedersen NC. Genetic

susceptibility to feline infectious peritonitis in Birman cats. *Virus Res* 2013; 175: 58-63.

Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ. Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* 2006; 117: 17-37.

Gruendl S, Matiasek K, Matiasek L, Fischer A, Felten S, Jurina K, Hartmann K. Diagnostic utility of cerebrospinal fluid immunocytochemistry for diagnosis of feline infectious peritonitis manifesting in the central nervous system. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 576-85.

Gunn-Moore DA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 1998; 62: 193-205.

Haagmans BL, Egberink HF, Horzinek MC. Apoptosis and T-cell depletion during feline infectious peritonitis. *J Virol* 1996; 70: 8977-83.

Hagemeijer M, Rottier PJM, Haan C. Biogenesis and Dynamics of the Coronavirus Replicative Structures. *Viruses* 2012; 4: 3245.

Hartmann K, Binder C, Hirschberger J, Cole D, Reinacher M, Schroo S, Frost J, Egberink H, Lutz H, Hermanns W. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 781-90.

Hartmann K. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005; 35: 39-79.

Hasegawa T, Hasegawa A. Interleukin 1 alpha mRNA-expressing cells on the local inflammatory response in feline infectious peritonitis. *J Vet Med Sci* 1991; 53: 995-9.

Herrewegh AAPM, Vennema H, Horzinek MC, Rottier PJM, de Groot RJ. The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. *Virology* 1995a; 212: 622-31.

Herrewegh AAPM, de Groot RJ, Cepica A, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJM. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1995b; 33: 684-9.

Herrewegh AAPM, Mähler M, Hedrich HJ, Haagmans BL, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJM, de Groot RJ. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology* 1997; 234: 349-63.

Herrewegh AAPM, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJM, de Groot RJ. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol* 1998; 72: 4508-14.

Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324: 73-6.

Hirschberger J, Hartmann K, Wilhelm N, Frost J, Lutz H, Kraft W. Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis. *Tierarztl Prax* 1995; 23: 92-9.

Hohdatsu T, Nakamura M, Ishizuka Y, Yamada H, Koyama H. A study on the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline macrophages by monoclonal antibodies. *Arch Virol* 1991a; 120: 207-17.

Hohdatsu T, Sasamoto T, Okada S, Koyama H. Antigenic analysis of feline

coronaviruses with monoclonal antibodies (MAbs): preparation of MAbs which discriminate between FIPV strain 79-1146 and FECV strain 79-1683. *Vet Microbiol* 1991b; 28: 13-24.

Hohdatsu T, Okada S, Koyama H. Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine, and canine coronaviruses. *Arch Virol* 1991c; 117: 85-95.

Hohdatsu T, Okada S, Ishizuka Y, Yamada H, Koyama H. The prevalence of types I and II feline coronavirus infections in cats. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 557-62.

Hohdatsu T, Izumiya Y, Yokoyama Y, Kida K, Koyama H. Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. *Arch Virol* 1998a; 143: 839-50.

Hohdatsu T, Yamada M, Tominaga R, Makino K, Kida K, Koyama H. Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline alveolar macrophages and human monocyte cell line U937 by serum of cats experimentally or naturally infected with feline coronavirus. *J Vet Med Sci* 1998b; 60: 49-55.

Hok K. Demonstration of feline infectious peritonitis virus in conjunctival epithelial cells from cats. A simple and reliable method for clinical veterinary virology screening. *Apmis* 1989; 97: 820-4.

Hora AS, Asano KM, Guerra JM, Mesquita RG, Maiorka P, Richtzenhain LJ, Brandao PE. Intrahost diversity of feline coronavirus: a consensus between the circulating virulent/avirulent strains and the internal mutation hypotheses? *Scientific World Journal* 2013; 2013: 572325.

Hora AS, Tonietti PO, Taniwaki SA, Asano KM, Maiorka P, Richtzenhain LJ, Brandao PE. Feline coronavirus 3c protein: a candidate for a virulence marker? *Biomed Res Int* 2016; 2016: 8560691.

Horzinek MC, Osterhaus AD. The virology and pathogenesis of feline infectious peritonitis. Brief review. Arch Virol 1979a; 59: 1-15.

Horzinek MC, Osterhaus AD. Feline infectious peritonitis: a worldwide serosurvey. Am J Vet Res 1979b; 40: 1487-92.

Horzinek MC, Lutz H, Pedersen NC. Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline, and canine coronaviruses. Infect Immun 1982; 37: 1148-55.

Hoskins JD. Coronavirus infection in cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1993; 23: 1-16.

Hsieh LE, Huang WP, Tang DJ, Wang YT, Chen CT, Chueh LL. 3C protein of feline coronavirus inhibits viral replication independently of the autophagy pathway. Res Vet Sci 2013; 95: 1241-7.

Hsieh LE, Chueh LL. Identification and genotyping of feline infectious peritonitis-associated single nucleotide polymorphisms in the feline interferon- γ gene. Vet Res 2014; 45: 57.

Issekutz TB. In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 α , TNF- α , IFN- γ , and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. The relative importance of each integrin. J Immunol 1995; 154: 6533-40.

Jacobse-Geels HEL, Daha MR, Horzinek MC. Isolation and characterization of feline C3 and evidence for the immune complex pathogenesis of feline infectious peritonitis. J Immunol 1980; 125: 1606-10.

Jacobse-Geels HEL, Daha MR, Horzinek MC. Antibody, immune complexes, and complement activity fluctuations in kittens with experimentally induced feline infectious peritonitis. Am J Vet Res 1982; 43: 666-70.

Jacobse-Geels HEL, Horzinek MC. Expression of feline infectious peritonitis coronavirus antigens on the surface of feline macrophage-like cells. *J Gen Virol* 1983; 64: 1859-66.

Jaimes JA, Whittaker GR. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. *Virology* 2018; 517: 108-21.

Jinks MR, English RV, Gilger BC. Causes of endogenous uveitis in cats presented to referral clinics in North Carolina. *Vet Ophthalmol* 2016; 19 Suppl 1: 30-7.

Kennedy M, Boedeker N, Gibbs P, Kania S. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2001; 81: 227-34.

Kim Y, Liu H, Kankanamalage AC, Weerasekara S, Hua DH, Groutas WC, Chang KO, Pedersen NC. Correction: Reversal of the progression of fatal coronavirus infection in cats by a broad-spectrum coronavirus protease inhibitor. *PLoS Pathog* 2016; 12: e1005650.

Kipar A, Bellmann S, Kremendahl J, Köhler K, Reinacher M. Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 65: 243-57.

Kipar A, Kohler K, Leukert W, Reinacher M. A comparison of lymphatic tissues from cats with spontaneous feline infectious peritonitis (FIP), cats with FIP virus infection but no FIP, and cats with no infection. *J Comp Pathol* 2001; 125: 182-91.

Kipar A, May H, Menger S, Weber M, Leukert W, Reinacher M. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol* 2005; 42: 321-30.

Kipar A, Baptiste K, Barth A, Reinacher M. Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. *J Feline Med Surg*

2006; 8: 69-72.

Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, Bowker LJ, Lutz H. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. J Gen Virol 2010; 91: 1698-707.

Kipar A, Meli ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? Vet Pathol 2014; 51: 505-26.

Kiss I, Poland AM, Pedersen NC. Disease outcome and cytokine responses in cats immunized with an avirulent feline infectious peritonitis virus (FIPV)-UCD1 and challenge-exposed with virulent FIPV-UCD8. J Feline Med Surg 2004; 6: 89-97.

Klumperman J, Locker JK, Meijer A, Horzinek MC, Geuze HJ, Rottier PJM. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. J Virol 1994; 68: 6523-34.

Krijnse-Locker J, Ericsson M, Rottier PJM, Griffiths G. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. J Cell Biol 1994; 124: 55-70.

Kummrow M, Meli ML, Haessig M, Goenczi E, Poland A, Pedersen NC, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in switzerland. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12: 1209-15.

Kyuwa S, Tagawa Y, Shibata S, Doi K, Machii K, Iwakura Y. Murine coronavirus-induced subacute fatal peritonitis in C57BL/6 mice deficient in gamma interferon. J Virol 1998; 72: 9286-90.

Lappin MR, Burney DP, Dow SW, Potter TA. Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor of cats. Am J Vet Res 1996; 57: 1589-93.

Levy JK, Crawford PC, Lappin MR, Dubovi EJ, Levy MG, Alleman R, Tucker SJ, Clifford EL. Infectious diseases of dogs and cats on Isabela Island, Galapagos. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 60-5.

Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu Rev Virol* 2016; 3: 237-61.

Li X, Scott FW. Detection of feline coronaviruses in cell cultures and in fresh and fixed feline tissues using polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1994; 42: 65-77.

Licitra BN, Millet JK, Regan AD, Hamilton BS, Rinaldi VD, Duhamel GE, Whittaker GR. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1066-73.

Lin CN, Su BL, Huang HP, Lee JJ, Hsieh MW, Chueh LL. Field strain feline coronaviruses with small deletions in ORF7b associated with both enteric infection and feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 413-9.

Linn-Pearl RN, Powell RM, Newman HA, Gould DJ. Validity of aqueocentesis as a component of anterior uveitis investigation in dogs and cats. *Vet Ophthalmol* 2015; 18: 326-34.

Litster AL, Pogranichniy R, Lin TL. Diagnostic utility of a direct immunofluorescence test to detect feline coronavirus antigen in macrophages in effusive feline infectious peritonitis. *Vet J* 2013; 198: 362-6.

Longstaff L, Porter E, Crossley VJ, Hayhow SE, Helps CR, Tasker S. Feline coronavirus quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction on effusion samples in cats with and without feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 240-5.

Luria BJ, Levy JK, Lappin MR, Breitschwerdt EB, Legendre AM, Hernandez JA,

Gorman SP, Lee IT. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 287-96.

Lutz H, Gut M, Leutenegger CM, Schiller I, Wiseman A, Meli ML (2002) Kinetics of FCoV infection in kittens born in catteries of high risk for FIP under different rearing conditions. Proceedings of the Second International Feline Coronavirus/Feline Infectious Peritonitis Symposium. Glasgow, Scotland

Maggs DJ, Lappin MR, Nasisse MP. Detection of feline herpesvirus-specific antibodies and DNA in aqueous humor from cats with or without uveitis. *Am J Vet Res* 1999; 60: 932-6.

Meli ML, Kipar A, Müller C, Jenal K, Gönczi E, Borel N, Gunn-Moore D, Chalmers S, Lin F, Reinacher M, Lutz H. High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 69-81.

Montali RJ, Strandberg JD. Extraperitoneal lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol* 1972; 9: 109-21.

Motokawa K, Hohdatsu T, Aizawa C, Koyama H, Hashimoto H. Molecular cloning and sequence determination of the peplomer protein gene of feline infectious peritonitis virus type I. *Arch Virol* 1995; 140: 469-80.

Murphy BG, Perron M, Murakami E, Bauer K, Park Y, Eckstrand C, Liepnieks M, Pedersen NC. The nucleoside analog GS-441524 strongly inhibits feline infectious peritonitis (FIP) virus in tissue culture and experimental cat infection studies. *Vet Microbiol* 2018; 219: 226-33.

Nomura R, Kiyota A, Suzaki E, Kataoka K, Ohe Y, Miyamoto K, Senda T, Fujimoto T. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J Virol* 2004; 78: 8701-8.

Norris JM, Bosward KL, White JD, Baral RM, Catt MJ, Malik R. Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990–2002). *Aust Vet J* 2005; 83: 666-73.

Olsen CW, Corapi WV, Ngichabe CK, Baines JD, Scott FW. Monoclonal antibodies to the spike protein of feline infectious peritonitis virus mediate antibody-dependent enhancement of infection of feline macrophages. *J Virol* 1992; 66: 956-65.

Olsen CW. A review of feline infectious peritonitis virus: molecular biology, immunopathogenesis, clinical aspects, and vaccination. *Vet Microbiol* 1993; 36: 1-37.

Olyslaegers DA, Dedeurwaerder A, Desmarets LM, Vermeulen BL, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. Altered expression of adhesion molecules on peripheral blood leukocytes in feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2013; 166: 438-49.

Paltrinieri S, Parodi MC, Cammarata G. In vivo diagnosis of feline infectious peritonitis by comparison of protein content, cytology, and direct immunofluorescence test on peritoneal and pleural effusions. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 358-61.

Paltrinieri S. The feline acute phase reaction. *Vet J* 2008; 177: 26-35.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001; 357: 1777-89.

Parodi MC, Cammarata G, Paltrinieri S, Lavazza A, Ape F. Using direct immunofluorescence to detect coronaviruses in peritoneal in peritoneal and pleural effusions. *J Small Anim Pract* 1993; 34: 609-13.

Pastoret PP, Henroteaux M. Epigenetic transmission of feline infectious peritonitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1978; 1: 67-70.

Pedersen NC. Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1976; 37: 1449-53.

Pedersen NC, Boyle JF. Immunologic phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1980; 41: 868-76.

Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K, Fudge A, Barker J. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1981a; 42: 368-77.

Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K. Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am J Vet Res* 1981b; 42: 363-7.

Pedersen NC, Evermann JF, McKeirnan AJ, Ott RL. Pathogenicity studies of feline coronavirus isolates 79-1146 and 79-1683. *Am J Vet Res* 1984a; 45: 2580-5.

Pedersen NC, Black JW, Boyle JF, Evermann JF, McKeirnan AJ, Ott RL. Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. *Adv Exp Med Biol* 1984b; 173: 365-80.

Pedersen NC, Sato R, Foley JE, Poland AM. Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 83-8.

Pedersen NC, Allen CE, Lyons LA. Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 529-41.

Pedersen NC, Liu H, Dodd KA, Pesavento PA. Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. *Viruses* 2009; 1: 166-84.

Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 225-58.

Pedersen NC, Liu H, Scarlett J, Leutenegger CM, Golovko L, Kennedy H, Kamal FM. Feline infectious peritonitis: Role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. *Virus Res* 2012a; 165: 17-28.

Pedersen NC, Liu H, Scarlett J, Leutenegger CM, Golovko L, Kennedy H, Kamal FM. Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. *Virus Res* 2012b; 165: 17-28.

Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: virology and immunopathogenesis. *Vet J* 2014a; 201: 123-32.

Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: diagnostics and therapeutics. *Vet J* 2014b; 201: 133-41.

Pedersen NC, Eckstrand C, Liu H, Leutenegger CM, Murphy B. Levels of feline infectious peritonitis virus in blood, effusions, and various tissues and the role of lymphopenia in disease outcome following experimental infection. *Vet Microbiol* 2015; 175: 157-66.

Pedersen NC, Liu H, Durden M, Lyons LA. Natural resistance to experimental feline infectious peritonitis virus infection is decreased rather than increased by positive genetic selection. *Vet Immunol Immunopathol* 2016; 171: 17-20.

Pedersen NC, Kim Y, Liu H, Galasiti Kankanamalage AC, Eckstrand C, Groutas WC, Bannasch M, Meadows JM, Chang KO. Efficacy of a 3C-like protease inhibitor in treating various forms of acquired feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2018; 20: 378-92.

Pedersen NC, Perron M, Bannasch M, Montgomery E, Murakami E, Liepnicks M, Liu H. Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 2019; 21: 271-81.

Pesteanu-Somogyi LD, Radzai C, Pressler BM. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. J Feline Med Surg 2006; 8: 1-5.

Poland AM, Vennema H, Foley JE, Pedersen NC. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. J Clin Microbiol 1996; 34: 3180-4.

Porter E, Tasker S, Day MJ, Harley R, Kipar A, Siddell SG, Helps CR. Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. Vet Res 2014; 45: 49.

Powell CC, McInnis CL, Fontenelle JP, Lappin MR. *Bartonella* species, feline herpesvirus-1, and *Toxoplasma gondii* PCR assay results from blood and aqueous humor samples from 104 cats with naturally occurring endogenous uveitis. J Feline Med Surg 2010; 12: 923-8.

Regan AD, Shraybman R, Cohen RD, Whittaker GR. Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry of serotype II feline coronaviruses. Vet Microbiol 2008; 132: 235-48.

Regan AD, Whittaker GR. Utilization of DC-SIGN for entry of feline coronaviruses into host cells. J Virol 2008; 82: 11992-6.

Rissi DR. A retrospective study of the neuropathology and diagnosis of naturally occurring feline infectious peritonitis. J Vet Diagn Invest 2018; 1-8: 1040638718755833.

Rohrbach BW, Legendre AM, Baldwin CA, Lein DH, Reed WM, Wilson RB. Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. J Am Vet Med Assoc 2001; 218: 1111-5.

Rottier PJM, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ. Acquisition of

macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol* 2005; 79: 14122-30.

Shiba N, Maeda K, Kato H, Mochizuki M, Iwata H. Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. *Vet Microbiol* 2007; 124: 348-52.

Slauson DO, Finn JP. Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc* 1972; 160: 729-34.

Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 12): 2939-52.

Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Feline coronavirus antibodies in UK cats. *Vet Rec* 1992a; 131: 223-4.

Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Howard PE, Harbour DA. Coronavirus serology in healthy pedigree cats. *Vet Rec* 1992b; 131: 35-6.

Stoddart CA, Scott FW. Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *J Virol* 1989; 63: 436-40.

Stoddart ME, Gaskell RM, Harbour DA, Gaskell CJ. Virus shedding and immune responses in cats inoculated with cell culture-adapted feline infectious peritonitis virus. *Vet Microbiol* 1988; 16: 145-58.

Stranieri A, Probo M, Pisu MC, Fioletti A, Meazzi S, Gelain ME, Bonsembiante F, Lauzi S, Paltrinieri S. Preliminary investigation on feline coronavirus presence in the reproductive tract of the tom cat as a potential route of viral transmission. *J Feline Med Surg* 2019: 1098612x19837114.

Taharaguchi S, Soma T, Hara M. Prevalence of feline coronavirus antibodies in

Japanese domestic cats during the past decade. *J Vet Med Sci* 2012; 74: 1355-8.

Takano T, Hohdatsu T, Hashida Y, Kaneko Y, Tanabe M, Koyama H. A "possible" involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 2007; 119: 121-31.

Takano T, Kawakami C, Yamada S, Satoh R, Hohdatsu T. Antibody-dependent enhancement occurs upon re-infection with the identical serotype virus in feline infectious peritonitis virus infection. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 1315-21.

Takano T, Azuma N, Satoh M, Toda A, Hashida Y, Satoh R, Hohdatsu T. Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. *Arch Virol* 2009; 154: 775-81.

Takano T, Ohyama T, Kokumoto A, Satoh R, Hohdatsu T. Vascular endothelial growth factor (VEGF), produced by feline infectious peritonitis (FIP) virus-infected monocytes and macrophages, induces vascular permeability and effusion in cats with FIP. *Virus Res* 2011; 158: 161-8.

Tammer R, Evensen O, Lutz H, Reinacher M. Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 49: 177-82.

Tan SK, Sahoo MK, Milligan SB, Taylor N, Pinsky BA. Stability of Zika virus in urine: Specimen processing considerations and implications for the detection of RNA targets in urine. *J Virol Methods* 2017; 248: 66-70.

Tomar N, De RK. A brief outline of the immune system. *Methods Mol Biol* 2014; 1184: 3-12.

Van Hamme E, Dewerchin HL, Cornelissen E, Verhasselt B, Nauwynck HJ.

Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin. *J Gen Virol* 2008; 89: 2147-56.

Van Hamme E, Desmarets L, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. Intriguing interplay between feline infectious peritonitis virus and its receptors during entry in primary feline monocytes. *Virus Res* 2011; 160: 32-9.

Vennema H, Rossen JWA, Wesseling J, Horzinek MC, Rottier PJM. Genomic organization and expression of the 3' end of the canine and feline enteric coronaviruses. *Virology* 1992; 191: 134-40.

Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 1998; 243: 150-7.

Vennema H. Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution. *Vet Microbiol* 1999; 69: 139-41.

Vermeulen BL, Devriendt B, Olyslaegers DA, Dedeurwaerder A, Desmarets LM, Favoreel HW, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. Suppression of NK cells and regulatory T lymphocytes in cats naturally infected with feline infectious peritonitis virus. *Vet Microbiol* 2013; 164: 46-59.

Vogel L, Van der Lubben M, te Lintelo EG, Bekker CPJ, Geerts T, Schuijff LS, Grinwis GCM, Egberink HF, Rottier PJM. Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. *Vet Res* 2010; 41: 71-82.

Wang YT, Hsieh LE, Dai YR, Chueh LL. Polymorphisms in the feline TNFA and CD209 genes are associated with the outcome of feline coronavirus infection. *Vet Res* 2014; 45: 123.

Weill D, Wautier JL, Dosquet C, Wautier MP, Carreno MP, Boval B. Monocyte modulation of endothelial leukocyte adhesion molecules. *J Lab Clin Med* 1995;

125: 768-74.

Weiss RC, Dodds WJ, Scott FW. Disseminated intravascular coagulation in experimentally induced feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1980; 41: 663-71.

Weiss RC, Scott FW. Pathogenesis of feline infectious peritonitis: pathologic changes and immunofluorescence. *Am J Vet Res* 1981a; 42: 2036-48.

Weiss RC, Scott FW. Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1981b; 4: 175-89.

Weiss RC, Scott FW. Pathogenesis of feline infectious peritonitis: nature and development of viremia. *Am J Vet Res* 1981c; 42: 382-90.

Weiss RC, Cox NR. Evaluation of immunity to feline infectious peritonitis in cats with cutaneous viral-induced delayed hypersensitivity. *Vet Immunol Immunopathol* 1989; 21: 293-309.

Wolfe LG, Griesemer RA. Feline infectious peritonitis. *Path Vet* 1966; 3: 255-70.

Worthing KA, Wigney DI, Dhand NK, Fawcett A, McDonagh P, Malik R, Norris JM. Risk factors for feline infectious peritonitis in Australian cats. *J Feline Med Surg* 2012; 14: 405-12.

Xia S, Liu Q, Wang Q, Sun Z, Su S, Du L, Ying T, Lu L, Jiang S. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) entry inhibitors targeting spike protein. *Virus Res* 2014; 194: 200-10.

Zook BC, King NW, Robison RL, McCombs HL. Ultrastructural evidence for the viral etiology of feline infectious peritonitis. *Path Vet* 1968; 5: 91-5.

IX. DANKSAGUNG

Der größte Dank geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Katrin Hartman, die mir diese Arbeit ermöglicht hat. Danke für die vielen Tage in Reit im Winkl, in denen sowohl die Veröffentlichungen als auch wesentliche Teile der Doktorarbeit entstanden. Danke für die viele Zeit, die Du dir für mich genommen hast, Danke für die immerwährende Unterstützung und Geduld!

Vielen Dank auch an Dr. Michele Bergmann für Korrekturlesen und Layout-Hilfe, ein wesentlicher Beitrag, ohne den ich den Abgabetermin wohl nicht geschafft hätte.

Vielen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Kaspar Matiassek für die Erstellung des Studiendesigns, die Korrekturen der Publikationen und die wertvolle Hilfestellung bei jeglichen pathologischen und mikroskopischen Fragen.

Herzlichen Dank an Herrn Dr. Christian Leutenegger, Herrn Dr. Nikola Pantchev und Herrn Dr. Hans-Jörg Balzer von der Firma IDEXX für die PCR-Untersuchungen aller Proben, die hilfreichen Korrekturen und die Beantwortung aller Fragen zu jeder Zeit.

Ein großes Dankeschön auch an Frau Karin Stingl von der Tierpathologie der LMU. Sie war stets eine große Hilfe bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Ein immenses Dankeschön an Frau Dr. Sandra Felten. Zum einen für die Bereitstellung eines Teils der Proben sowie Informationen über Studienpatienten, vor allem aber für die Anleitung und Hilfe am Anfang des praktischen Teils der Studien und für die unzähligen konstruktiven Diskussionen und Ratschläge.

Von Herzen danke ich Dir, Max, der Du mich immer unterstützt und bei kurzen Krisen wieder aufgefangen und motiviert hat. Ohne Dich würde mir in meinem Leben Einiges fehlen.

Meinen Eltern habe ich es schlussendlich zu verdanken, dass ich heute an dieser Stelle stehe. Danke für euren unerschütterlichen Glauben an mich, Danke für eure Unterstützung in jeglicher Hinsicht während des gesamten Studiums, Danke für die unzähligen Care-Pakete und Telefonate vor den Prüfungen. Danke, dass ihr immer für mich da seid, und ich mich uneingeschränkt auf euch verlassen kann.